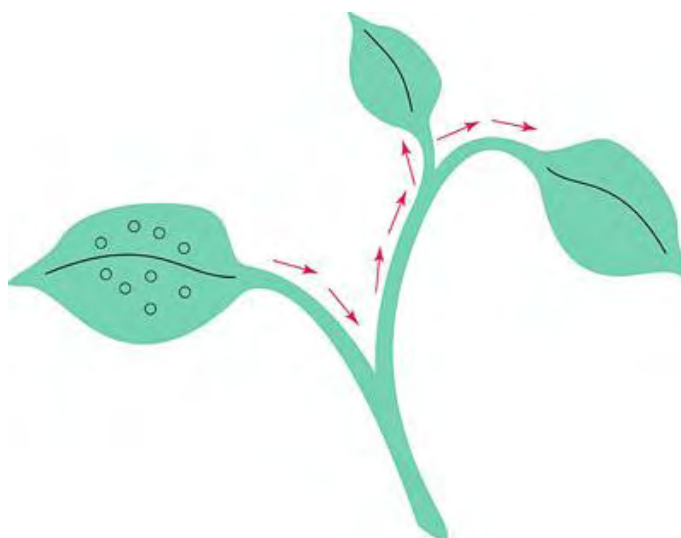


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Σχολή Γεωπονικών Επιστημών
Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«Αειφόρος Αγροτική Παραγωγή και Διαχείριση Περιβάλλοντος»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Επίδραση της έκφρασης της χαρπίνης SP/HrpZ_{sph} στην ανθεκτικότητα και στο
ρυθμό ανάπτυξης διαγονιδιακών φυτών



ΖΙΑΝΝΑ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

Βόλος 2018

Επίδραση της έκφρασης της χαρπίνης SP/hrpZ στην ανθεκτικότητα
και στο ρυθμό ανάπτυξης διαγονιδιακών φυτών

Ζιάννα Ευαγγελία

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Παυλή Ουρανία, Επικ. Καθηγήτρια, Γενετική Βελτίωση Φυτών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Χα Ιμπραχίμ, Αβραάμ, Καθηγητής, Γενετική Βελτίωση Φυτών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αναστασία Ταμπακάκη, Αναπλ. Καθηγήτρια, Εργαστήριο Γενικής & Γεωργικής
Μικροβιολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Copyright © *ZIANNA EYAGGELIA*, 2016.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναγράφεται η πηγή προέλευσης.

Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης από το Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δε δηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

Πρόλογος

Αρχικά, για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην κα. Ουρανία Παυλή, Επικ. Καθηγήτρια του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του ΠΘ, στην οποία οφείλω όχι μόνο την εργασία αυτή, αλλά και την συνέχιση των σπουδών μου σε μεταπτυχιακό επίπεδο. Την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και την επίβλεψή της καθ' όλη την διάρκειά του.

Ακολούθως, στον κ. Αβραάμ Χα, Καθηγητή του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του ΠΘ και Διευθυντή του Εργαστηρίου για τις εύστοχες παρατηρήσεις του και τη συνεισφορά του στη διεξαγωγή του πειράματος.

Στην κα. Αναστασία Ταμπακάκη, Αναπλ. Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του ΓΠΑ, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για την παροχή χρήσιμων πληροφοριών για την διεξαγωγή και συγγραφή της διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον κ. Κωνσταντίνο Αλιφέρη, Λέκτορα του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του ΓΠΑ, για την πολύτιμη συνεισφορά του στις αναλύσεις της μεταβολομικής, στην ανάλυση των αποτελεσμάτων αλλά και στη συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που με στήριξε σ' αυτή μου την προσπάθεια, για την αμέριστη βοήθεια που μου πρόσφεραν και τη συνεχή συμπαράσταση τους.

Περίληψη

Με δεδομένη την αποδεδειγμένη ιδιότητα των χαρπινών, κατά την ενδογενή έκφραση ή την εξωγενή εφαρμογή τους, να επάγουν τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών, στόχο της μεταπτυχιακής διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση της επίδρασης της χαρπίνης HrpZ_{Psph}, που προέρχεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana*. Η έκφραση της HrpZ_{Psph}, στην εκκρινόμενη μορφή της (SP/HrpZ_{Psph}) ώστε να κατευθύνεται η συσσώρευση της πρωτεΐνης εξωκυτταρικά, έχει αποδειχθεί ότι προσδίδει ανθεκτικότητα στον ιό *Beet necrotic yellow vein virus*, που προκαλεί την ασθένεια της ριζομανίας, σε διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* καθώς και σε διαγονιδιακές ρίζες ζαχαρότευτλου. Στην παρούσα μελέτη αξιοποιήθηκαν διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν τη χαρπίνη SP/HrpZ_{Psph}, ενώ στόχο αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης του διαγονιδίου SP/hrpZ_{Psph} ως προς i) την ανθεκτικότητα έναντι ασθενειών και ii) το μεταβολισμό των φυτών. Αρχικά, έγινε αξιολόγηση των διαγονιδιακών σειρών προκειμένου να επιλεγούν ομοζύγωτες για το διαγονίδιο SP/hrpZ_{Psph} σειρές που θα αποτελέσουν το φυτικό υλικό για τα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας και της μεταβολομικής. Αφού επιβεβαιώθηκε η ενσωμάτωση του SP/hrpZ_{Psph}, μέσω PCR, έγινε συγκριτική αξιολόγηση της ανθεκτικότητας των επιλεγμένων ομοζύγων σειρών με φυτά αγρίου τύπου έναντι της ασθένειας της βακτηριακής κηλίδωσης, που προκαλείται από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000). Για το σκοπό αυτό, διενεργήθηκαν τεχνητές μολύνσεις με αιώρημα κυττάρων και ακολούθησε η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας σε μακροσκοπικό επίπεδο και με την εκτίμηση της αποίκησης του παθογόνου. Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα υπογραμμίζουν την ύπαρξη σημαντικών διαφορών μεταξύ των διαγονιδιακών και των φυτών αγρίου τύπου οι οποίες εκφράζονται με ηπιότερη και καθυστερημένη ανάπτυξη των συμπτωμάτων της ασθένειας αλλά και με τη μειωμένη αποίκηση του βακτηρίου στα διαγονιδιακά φυτά. Στο πλαίσιο της μεταβολομικής, έγινε εκχύλιση των μεταβολιτών και ακολούθησε ανάλυση σε πλατφόρμα αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με ανιχνευτή μάζας. Τέλος, έγινε επεξεργασία των μεταβολικών προφίλ προκειμένου να ελεγχθούν οι τάσεις στα δεδομένα καθώς και να προσδιοριστούν οι σημαντικοί βιοδείκτες. Το μεταβολικό προφίλ αποτελούνταν στο μεγαλύτερο ποσοστό του από μεταβολίτες που ανήκουν στη χημική ομάδα των υδατανθράκων, ενώ ένα ποσοστό αυτών ανήκουν σε άλλες ομάδες όπως αμινοξέα, αλκοόλες, αμίνες, καρβοξυλικά οξέα, λιπαρά οξέα, ανόργανα οξέα, νουκλεϊκά οξέα, παράγωγα φωσφορικού οξέος, πολυαμίνες και λιπίδια γλυκερόλης. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι οι διαγονιδιακές σειρές διαφέρουν με τα wt

φυτά, επιβεβαιώνοντας τη σημαντική επίδραση του *hrpZ_{P_{sph}}* στο μεταβολισμό του φυτού, ενώ παράλληλα καταδεικνύουν τη διαφοροποίηση μεταξύ των διαφορετικών *hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακών σειρών, γεγονός που οφείλεται στο ότι οι T₂ σειρές συνιστούν απογόνους αυτογονιμοποίησης διαφορετικών συμβάντων μετασχηματισμού. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα δεδομένα της μεταβολομικής καθιστούν εφικτό τον προσδιορισμό συγκεκριμένων μεταβολικών μορίων τα οποία μπορεί να αποτελέσουν σημαντικούς βιοδείκτες προς την επίτευξη ανθεκτικότητας μέσω της έκφρασης της SP/HrpZ_{P_{sph}}.

Λέξεις κλειδιά: SP/HrpZ_{P_{sph}}, *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, χαρπίνες, *Nicotiana benthamiana*, ευρεία ανθεκτικότητα έναντι καταπονήσεων, μεταβολομική, βιοδείκτες

Summary

Given that harpin proteins, upon external application or endogenous expression in plants, are capable of inducing defense mechanisms, this MSc thesis is aimed at unravelling the effect of harpin HrpZ_{P_{sph}} expression, originating from the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants. The expression of HrpZ_{P_{sph}}, in its secretable form (SP/HrpZ_{P_{sph}}) in order to direct protein accumulation extracellularly, has proven capable of conferring resistance against *Beet necrotic yellow vein virus*, the causal agent of rhizomania disease, both in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants and transgenic sugar beet roots. In this study, the genetic material referred to SP/HrpZ_{P_{sph}}-transgenic lines which were investigated in order to gain insight into the effect of SP/hrpZ_{P_{sph}} in relation to i) disease resistance and ii) plant metabolism. In this framework, transgenic lines were initially assessed as a means to select for homozygous for the transgene SP/hrpZ_{P_{sph}} lines which will form the genetic material for the experiments of resistance evaluation and metabolomics. The selected transgenic lines, in which SP/hrpZ_{P_{sph}} integration was verified, by PCR, were subsequently evaluated for resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000) in comparison with wild type plants. To this purpose, transgenic lines were challenge-inoculated with a bacterial suspension and evaluated on the basis of symptom development and bacterial colonization. In total, findings underline the differential response of transgenic lines and wild type plants, expressed as mild and delayed symptom development as well as reduced bacterial colonization in transgenic lines. For metabolomics, following metabolite extraction, metabolite profiling on was performed by Gas-chromatography combined with Mass-spectrometry (GC/MS). Finally, data matrices were subjected to multivariate analyses for the detection of trends and the determination of important biomarkers. The vast majority of identified metabolites belong to the group of carbohydrates, while a portion of those was classified in other chemical groups, i.e. amino acids, alcohols, amines, carboxylic acids, fatty acids, inorganic acids, nucleic acids, phosphates, polyamines and glycerolipids. Overall findings point to a separation of transgenic and wild type plants, thus verifying the substantial effect of hrpZ_{P_{sph}} in plant metabolism. In parallel, the results revealed the existence of important differences among hrpZ_{P_{sph}}-transgenic lines, which are mainly attributed to the fact that T₂ lines consist progeny originating from selfing of different transformation events. Metabolomics data allowed for the discovery of metabolites-biomarkers associated with resistance due to expression of SP/HrpZ_{P_{sph}}.

Keywords: SP/HrpZ_{P_{sph}}, *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, harpins, *Nicotiana benthamiana*, broad range resistance, metabolomics, biomarkers

Εγώ η Ευαγγελία Ζιάννα είμαι ο συγγραφέας αυτής της Μ.Δ.Ε. Αυτή η Μ.Δ.Ε. αντικατοπτρίζει την έρευνα που έγινε από εμένα και δεν έχει υποβληθεί (εξ ολοκλήρου ή μέρος της) σαν προπτυχιακή διατριβή ή Μ.Δ.Ε. ή ως μέρος Διδακτορικής Διατριβής σε αυτό ή άλλο Προπτυχιακό ή Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Ιδρυμάτων Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης του εσωτερικού ή εξωτερικού. Όποια συνεργασία καθώς και το μέγεθος αυτής δηλώνονται επακριβώς στο αντίστοιχο πεδίο αυτής της διατριβής. Επίσης έχω διαβάσει όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές που παρατίθενται στο τέλος.

Ως επιβλέπουσα της έρευνας που περιγράφεται σε αυτή τη διατριβή, δηλώνω ότι όλοι οι όροι του Εσωτερικού Κανονισμού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος έχουν τηρηθεί από την κα. Ευαγγελία Ζιάννα.



Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	1
1.1. Γενικά	1
1.2. Μηχανισμοί άμυνας των φυτών.....	3
1.3. Σχέση <i>R – avr</i>	7
1.4. Αντίδραση Υπερευαισθησίας	8
1.5. Βιοχημικά μονοπάτια.....	10
1.6.1 Το μονοπάτι Βιοσύνθεσης Σαλικυλικού Οξέος	11
1.6.2 Το μονοπάτι Βιοσύνθεσης Ιασμονικού Οξέος	13
1.6.3 Το Μονοπάτι Βιοσύνθεσης Αιθυλενίου	14
1.6.4 Το Μονοπάτι Βιοσύνθεσης Αμπισισικού Οξέος	15
1.6. Εκκριτικό σύστημα Τύπου III.....	17
1.7. Χαρπίνες	19
1.8. Ο ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά	23
1.9. Μεταβολομική	27
1.10. Η συμβολή της Μοριακής Βελτίωσης	28
1.11. Το είδος <i>Nicotiana benthamiana</i>	31
Σκοπός της Μελέτης.....	33
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	34
2.1. Φυτικό υλικό.....	34
2.2. Αξιολόγηση – Επιλογή κατάλληλων διαγονιδιακών σειρών.....	35
2.2.1 Έλεγχος ομοζυγωτίας	35
2.2.2 Έλεγχος για την ένθεση του διαγονιδίου <i>SP/hrpZ_{Psph}</i>	36
2.3. Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας των διαγονιδιακών φυτών έναντι του βακτηρίου <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato	37
2.4. Μεταβολομική ανάλυση των διαγονιδιακών σειρών	38
3. Αποτελέσματα	42
3.1. Αξιολόγηση διαγονιδιακών σειρών	42

3.2.	Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έναντι του βακτηρίου <i>P. syringae</i> pv. tomato	45
3.3.	Επίδραση του διαγονιδίου <i>SP/hrpZ_{P_{sph}}</i> στη μεταβολική σύσταση των φυτών <i>N. benthamiana</i>	48
4.	Συζήτηση	68
5.	Βιβλιογραφία	74

Κατάλογος Συντομογραφιών

ABA: Absciscic acid, αμπισισικό οξύ

avr: avirulence, αμολυσματικότητα

BNYVV: *Beet necrotic yellow vein virus*, ιός της ριζομανίας των ζαχαρότευτλων

bp: base pairs, ζεύγη βάσεων

dNTPs: deoxy-nucleotides triphosphates, τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια

ET: Ethylene, αιθυλένιο

HCD: Hypersensitive cell death

HR: Hypersensitive response, αντίδραση υπερευαισθησίας

Hrc: hypersensitive response and conserved

Hrp: hypersensitive response and pathogenity

Hrp_{EA}: harpin *Erwinia amylovora*

Hrp_N: harpin N

hrp_Z: harpin Z gene

Hrp_{Z_{sph}}: harpin Z *Pseudomonas syingae* pv. phaseolicola

Hrp_{Z_{ss}}: harpin Z *Pseudomonas syringae* pv. syringae

JA: Jasmonate acid, ιασμονικό οξύ

LB: Luria-Bertani (LB) broth

Mbp: Mega base pairs

MS: Murashige and Skoog

OD: Optical Density, Οπτική Πυκνότητα

PCR: Polymerase Chain Reaction

PR: pathogenesis-related

PVX: Potato virus X

RNase: ribonuclease

SA: Salicylic Acid, Σαλικυλικό Οξύ

SAR: Systemic Acquired Resistance, διασυστηματική επίκτητη ανθεκτικότητα

SP/*hrpZ_{P_{sph}}*: Secretion peptide/harpin Z, *Pseudomonas syingae* pv. phaseolicola

TTSS (T3SS): Type Three Secretion System, Εκκριτικό Σύστημα Τύπου ΙΙΙ

WT: Wild type plants, φυτά αγρίου τύπου

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 2.1 Διαγονιδιακές σειρές και φυτά αγρίου τύπου του είδους <i>N. benthamiana</i> που αξιοποιήθηκαν στα πειράματα της μεταβολομικής	39
Πίνακας 3.1 Κατηγοριοποίηση μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στη <i>SP/hrpZ_{P_{sph}}</i> -διαγονιδιακή σειρά 160-12, βάσει της συμμετοχής τους σε βιοσυνθετικά μονοπάτια	55
Πίνακας 3.2 Κατηγοριοποίηση μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στη <i>SP/hrpZ_{P_{sph}}</i> -διαγονιδιακή σειρά 161-80, βάσει της συμμετοχής τους σε βιοσυνθετικά μονοπάτια	57
Πίνακας 3.3 Κατηγοριοποίηση μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στη <i>SP/hrpZ_{P_{sph}}</i> -διαγονιδιακή σειρά 166-19, βάσει της συμμετοχής τους σε βιοσυνθετικά μονοπάτια	60
Πίνακας 3.4 Κατηγοριοποίηση μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στη <i>SP/hrpZ_{P_{sph}}</i> -διαγονιδιακή σειρά 167-8, βάσει της συμμετοχής τους σε βιοσυνθετικά μονοπάτια	63
Πίνακας 3.5 Κατηγοριοποίηση μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στη <i>SP/hrpZ_{P_{sph}}</i> -διαγονιδιακή σειρά 169-10, βάσει της συμμετοχής τους σε βιοσυνθετικά μονοπάτια	66

Κατάλογος Εικόνων-Σχημάτων

Εικόνα 1.1 Τα φυτά ως μέρη του μέρη του οικοσυστήματος - Αλληλεπίδραση με πληθώρα παραγόντων καταπόνησης	2
Εικόνα 1.2 Απόκριση των φυτών σε παράγοντες καταπόνησης - Ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας.	3
Εικόνα 1.3 Απόκριση των φυτών στις καταπονήσεις. Η αλληλεπίδραση μεταξύ φυτού και παράγοντα καταπόνησης εξαρτάται από πρόσθετους παράγοντες που σχετίζονται τόσο με το φυτό όσο και με την καταπόνηση.	4
Εικόνα 1.4 Οδοί άμυνας των φυτών-ξενιστών. Τα φυτά αμύνονται έναντι των καταπονήσεων σε δύο επίπεδα που αφορούν στη συστατική προϋπάρχουσα άμυνα και στην επαγόμενη άμυνα που ενεργοποιείται κατόπιν της προσβολής.	6
Εικόνα 1.5 Γονίδια και αλληλεπιδράσεις φυτών – παθογόνων. Εάν το γονίδιο <i>anr</i> του παθογόνου, που κωδικεύει ένα διεγέρτη, αναγνωρίζεται από το γονίδιο <i>R</i> του φυτού, που κωδικεύει έναν υποδοχέα, επιτυγχάνεται πρόσδεση διεγέρτη-υποδοχέα που οδηγεί στην εκδήλωση ανθεκτικότητας.	7
Εικόνα 1.6 Αλληλεπίδραση της προερχόμενης από το παθογόνο <i>Anr</i> πρωτεΐνης με την <i>R</i> πρωτεΐνη του φυτού ξενιστή και ενεργοποίηση της αντίδρασης υπερευαισθησίας.	9
Εικόνα 1.7 Βιοχημικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη μεταφορά του σήματος και την ενεργοποίηση της άμυνας του φυτού.	10
Εικόνα 1.8 Τα δομικά χαρακτηριστικά του Εκκριτικού Συστήματος Τύπου 3 (T3SS). Τα κύρια συστατικά του αφορούν σε δομικές πρωτεΐνες (structural proteins), πρωτεΐνες-τελεστές (effectors) και συνοδούς (chaperons).	18
Εικόνα 1.9 Σχηματική απεικόνιση του ρόλου των χαρπινών στα φυτά.	23
Εικόνα 1.10 Ως απόκριση στις συνθήκες του περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσονται, τα φυτά παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι εμπλέκονται σε επαγόμενους μηχανισμούς άμυνας, στην υγεία και θρέψη καθώς και σε σημαντικά οργανοληπτικά γνωρίσματα.	25
Εικόνα 2.1 Σχηματική απεικόνιση της γονιδιακής κασέτας που χρησιμοποιήθηκε για το γενετικό μετασχηματισμό φυτών του είδους <i>N. benthamiana</i> .	34
Εικόνα 2.2 Βλάστηση σπόρων επιλεγμένων ομοζύγων σειρών σε ατομικά γλαστράκια τύρφης (jiffy pots), ανάπτυξη νεαρών σποροφύτων και μεταφορά σε γλάστρες για ατομική ανάπτυξη.	36
Εικόνα 2.3 Στάδιο φυτών κατά τη δειγματοληψία. Η συγκομιδή του φυτικού ιστού αφορούσε σε 2 μεσαία φύλλα ανά φυτό.	40
Εικόνα. 3.1 Επιλογή σπόρων μετασχηματισμένων σειρών του είδους <i>Nicotiana benthamiana</i> (T ₂ γενιά) σε θρεπτικό μέσο επιλογής που περιέχει υγρομυκίνη.	42

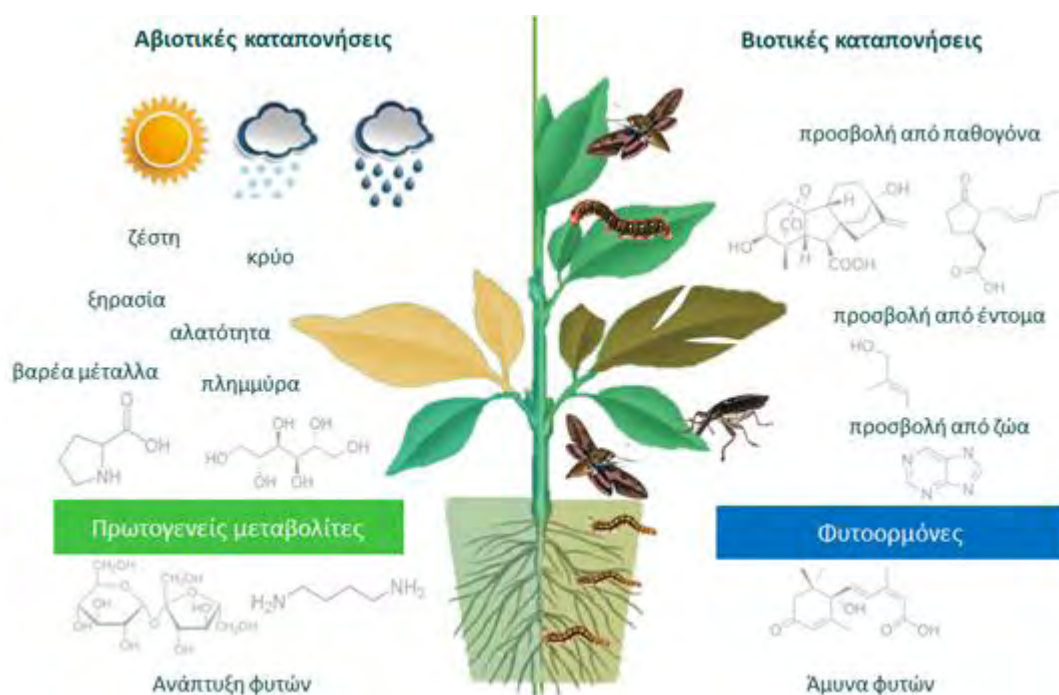
Εικόνα. 3.2 Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της χρησιμοποιούμενης πίεσης επιλογής, μέσω βλάστησης σπόρων αγρίου τύπου (wt) του είδους <i>Nicotiana benthamiana</i> παρουσία και απουσία του αντιβιοτικού επιλογής υδρομυκίνη.	43
Εικόνα. 3.3 Συγκριτική αξιολόγηση της ανάπτυξης σε φυτά της διαγονιδιακής σειράς 169-10, που εκφράζει τη χαρπίνη SP/HrpZ _{P_{sph}} και φυτά αγρίου τύπου (wt) του είδους <i>N. benthamiana</i> .	44
Εικόνα. 3.4 Προϊόντα ενίσχυσης PCR σε μετασχηματισμένα φυτά του είδους <i>N. benthamiana</i> .	45
Εικόνα 3.5 Συμπτωματολογία της ασθένειας της βακτηριακής κηλίδωσης, 4 ημέρες μετά από μόλυνση με το βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (DC3000) σε φυτά αγρίου τύπου του είδους <i>N. benthamiana</i> .	46
Εικόνα 3.6 Συμπτωματολογία της ασθένειας της βακτηριακής κηλίδωσης, έπειτα από μόλυνση με το βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (DC3000) σε διαγονιδιακά φυτά του είδους <i>N. benthamiana</i> που εκφράζουν το γονίδιο SP/hrpZ _{P_{sph}} .	47
Εικόνα 3.7 Ανάπτυξη αποικιών του βακτηρίου <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (DC3000), από ομογενοποιημένα εκχυλίσματα Pst DC3000-μολυσμένων φύλλων 4 ημέρες μετά από μόλυνση των φυτών του είδους <i>N. benthamiana</i> .	48
Εικόνα 3.8 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (OPLS-DA score plot) για την επίδραση του διαγονιδίου hrpZ _{P_{sph}} στο μεταβολισμό φυτών του είδους <i>N. benthamiana</i> .	50
Εικόνα 3.9 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (OPLS-DA score plot) για την επίδραση του διαγονιδίου hrpZ _{P_{sph}} στο μεταβολισμό φυτών του είδους <i>N. benthamiana</i> .	51
Εικόνα 3.10 Δενδρόγραμμα ιεραρχικής ανάλυσης κατά συστάδες (Hierarchical cluster analysis, HCA dendrogram) των GC/MS μεταβολικών προφίλ των διαγονιδιακών και αγρίου τύπου φυτών, όπου απεικονίζεται η ομαδοποίηση των επεμβάσεων και οι μεταξύ τους αποστάσεις.	52
Εικόνα 3.11 Σύνοψη της επίδρασης του διαγονιδίου hrpZ _{P_{sph}} στο μεταβολικό προφίλ των φυτών <i>N. benthamiana</i> .	53
Εικόνα 3.12 Επίδραση του διαγονιδίου SP/hrpZ _{P_{sph}} στα βιοσυνθετικά μονοπάτια της σειράς 160-12.	54
Εικόνα 3.13 Επίδραση του διαγονιδίου SP/hrpZ _{P_{sph}} στα βιοσυνθετικά μονοπάτια της σειράς 161-80.	57
Εικόνα 3.14 Επίδραση του διαγονιδίου SP/hrpZ _{P_{sph}} στα βιοσυνθετικά μονοπάτια της σειράς 166-19.	59
Εικόνα 3.15 Επίδραση του διαγονιδίου SP/hrpZ _{P_{sph}} στα βιοσυνθετικά μονοπάτια της σειράς 167-8.	62
Εικόνα 3.16 Επίδραση του διαγονιδίου SP/hrpZ _{P_{sph}} στα βιοσυνθετικά μονοπάτια της σειράς 161-80.	65

1. Εισαγωγή

1.1. Γενικά

Στη φύση, η ανάπτυξη και παραγωγικότητα των φυτών συχνά περιορίζονται από πληθώρα παραγόντων καταπόνησης, γεγονός που οφείλεται κατά κύριο λόγο στη σταθερή τους θέση και την αδυναμία αποφυγής της επικρατούσας καταπόνησης. Οι παράγοντες καταπόνησης διακρίνονται σε βιοτικούς, όπου περιλαμβάνονται τα φυτοπαθογόνα βακτήρια, μύκητες, ιοί, ιοειδή αλλά και τα έντομα και τρωκτικά, και αβιοτικούς, όπου συγκαταλέγονται η ανεπάρκεια/υπερεπάρκεια εδαφικής υγρασίας, η αλατότητα, οι ακραίες υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες, η υπεριώδης ακτινοβολία καθώς και η παρουσία βαρέων μετάλλων ή άλλων ξενοβιοτικών ουσιών. Ως απόκριση στις προαναφερθείσες καταπονήσεις, τα φυτά έχουν αναπτύξει, μέσω της εξελικτικής διαδικασίας, ποικίλους μηχανισμούς άμυνας ή/και προσαρμογής προκειμένου να καταστεί εφικτή η εξασφάλιση της επιβιώσής τους (Εικόνα 1.1). Εναλλακτικά, η χρήση των φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων αποτελεί έναν αποτελεσματικό τρόπο πρόληψης ή αντιμετώπισης του παράγοντα καταπόνησης και μείωσης των οφειλόμενων σε αυτόν απωλειών.

Εν όψει του γεγονότος ότι η σύγχρονη γεωργία απαιτεί την ορθολογική διαχείριση των διαθέσιμων πόρων και την κατά το δυνατό ελαχιστοποίηση των απαιτούμενων εισροών, βασικό στόχο αποτελεί η ανάπτυξη αειφόρων συστημάτων παραγωγής που θα βασίζονται ταυτόχρονα στην ανάπτυξη ανθεκτικού γενετικού υλικού. Στο πλαίσιο αυτό, η επιστήμη της Βελτίωσης Φυτών καλείται να συμβάλει προς τη δημιουργία υψηλοαποδοτικών ανθεκτικών ποικιλιών που απαιτούν τη χρήση μειωμένων εισροών και παρουσιάζουν προσαρμοστικότητα σε ποικίλα περιβάλλοντα καλλιέργειας. Η βελτιωτική προσπάθεια, που περιλαμβάνει είτε τις μεθόδους της κλασικής βελτίωσης είτε τις μεθόδους και εργαλεία της μοριακής βιολογίας, καθώς και συνδυασμό των δύο προσεγγίσεων, αποδίδει λύσεις σε προβλήματα όπως είναι η ορθολογική χρήση του νερού, η αποτελεσματική πρόσληψη των θρεπτικών στοιχείων, η σταθερή ανθεκτικότητα και ανταγωνιστικότητα καθώς και η σταθερότητα της απόδοσης σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες.



Εικόνα 1.1 Τα φυτά ως μέρη του μέρη του οικοσυστήματος - Αλληλεπίδραση με πληθώρα παραγόντων καταπόνησης.

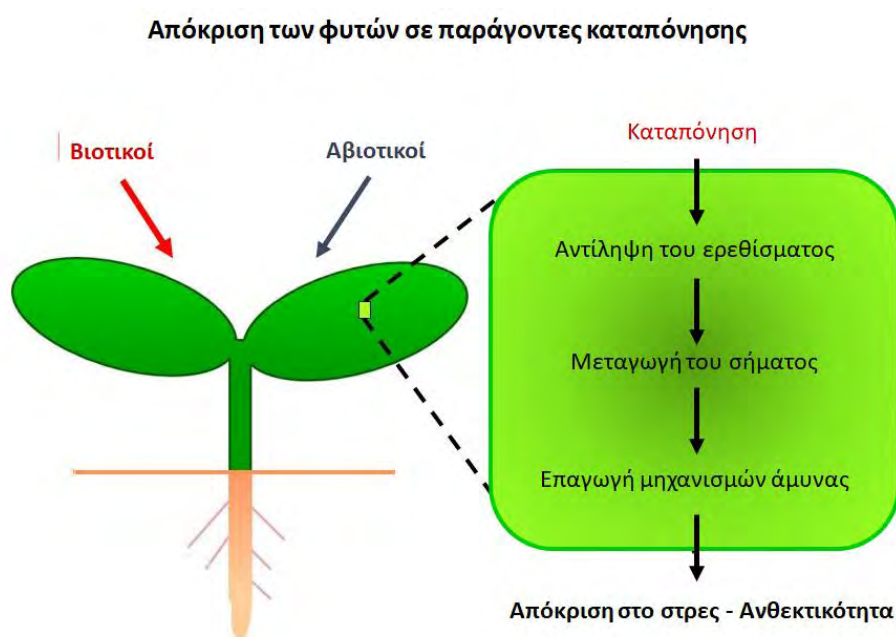
(Πηγή: <http://orbitbiotech.com/temperature-stress-plants-high-temperature-stress/responses-of-a-plant-against-abiotic-stress-orbit-biotech-training/>)

Στο παρελθόν, οι μέθοδοι της Κλασικής Βελτίωσης έχουν βοηθήσει να επιτευχθούν μεγάλα βήματα προόδου. Ωστόσο, οι διαδικασίες αυτές συχνά θεωρούνται αργές και αναποτελεσματικές, γεγονός που οφείλεται στο ότι α) οι απαιτήσεις της σύγχρονης γεωργίας αλλάζουν με ραγδαίο ρυθμό, β) τα αποθέματα των διαθέσιμων φυσικών πόρων μειώνονται ολοένα και περισσότερο, γ) καθίσταται αναγκαία η συνεχής αναβάθμιση της γενετικής ανθεκτικότητας στις ασθένειες, λόγω των ακατάπαυστων αλλαγών στην επιδημιολογία αγρού και στη μοριακή επιδημιολογία των παθογόνων και δ) έχει σημειωθεί εξάντληση των φυσικών πηγών ανθεκτικότητας για το σύνολο σχεδόν των επιζήμιων ασθενειών και εχθρών. Προς την κατεύθυνση αυτή, οι σύγχρονες μέθοδοι βελτίωσης και βιοτεχνολογίας, συμπεριλαμβανομένου της Γενετικής Μηχανικής, δύνανται να συμβάλουν καθοριστικά στην επίλυση προβλημάτων που αποτελούν στενωπό για την αγροτική παραγωγή.

1.2. Μηχανισμοί άμυνας των φυτών

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και άλλων οργανισμών ή και αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης παίζουν κεντρικό ρόλο τόσο σε επίπεδο λειτουργίας των οικοσυστημάτων όσο και σε επίπεδο καλλιέργειας. Είναι γνωστό ότι η αλληλεπίδραση του φυτού με τους παθογόνους οργανισμούς είναι περίπλοκη και δυναμική διαδικασία που κινείται σε ένα ευρύ φάσμα και τελικά οδηγεί στην εκδήλωση ασθένειας, στην εκδήλωση ανθεκτικότητας ή στην εδραίωση συμβιωτικής σχέσης προς αμοιβαίο όφελος των αλληλεπιδρώντων οργανισμών.

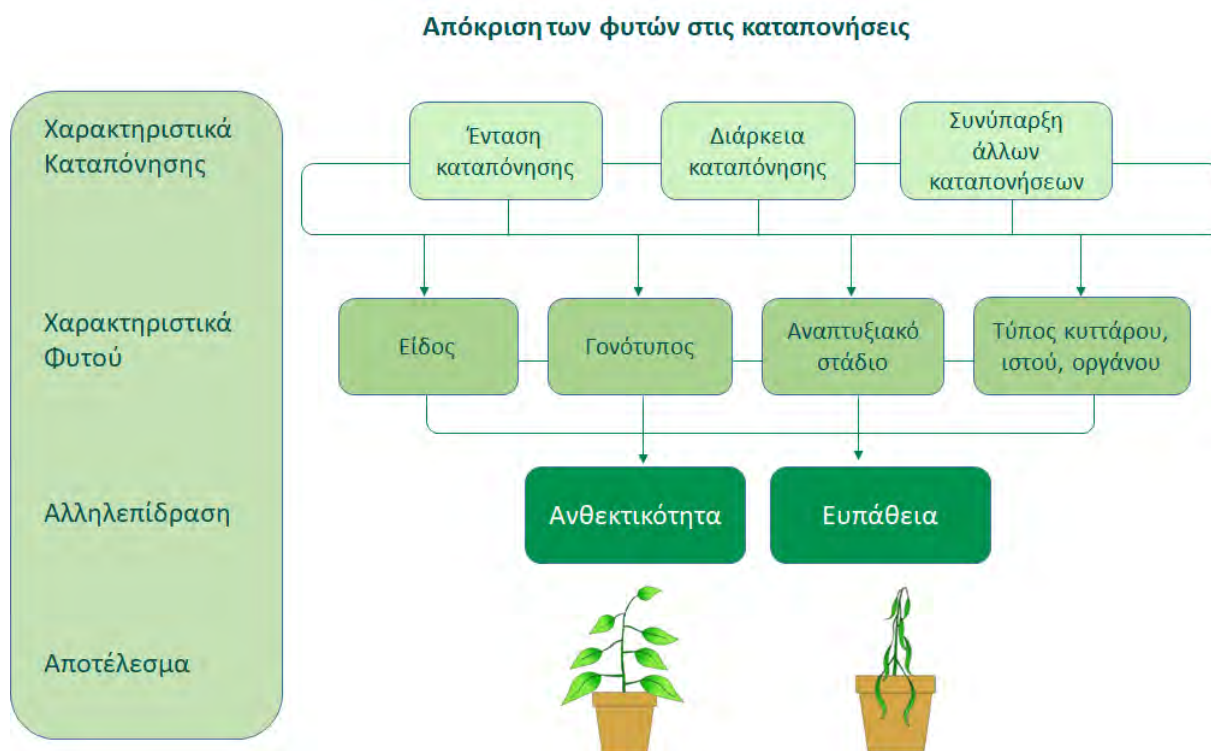
Σε όλες τις περιπτώσεις, οι παρατηρούμενες αλληλεπιδράσεις αποτελούν προϊόντα συνεξέλιξης που έχουν διαμορφωθεί υπό τη δράση της φυσικής και τεχνητής επιλογής και παρουσιάζουν σημαντική εξειδίκευση σε επίπεδο φυτικού είδους και αλληλεπιδρώντος οργανισμού. Καθοριστικό ρόλο παίζει η ικανότητα των φυτικών κυττάρων να αναγνωρίζουν τον παράγοντα καταπόνησής τους και η μεταγωγή του σήματος που αποσκοπεί στη μετέπειτα ενεργοποίηση των διαθέσιμων μηχανισμών άμυνας (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2 Απόκριση των φυτών σε παράγοντες καταπόνησης - Ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας. Προϋπόθεση αποτελεί η αντίληψη του ερεθίσματος και η μεταγωγή του σήματος σε επίπεδο φυτού.

Ένας οργανισμός για να προκαλέσει ασθένεια σε κάποιο φυτό, θα πρέπει να υπερνικήσει τους αμυντικούς μηχανισμούς του και ειδικότερα, να καταστείλει τις βασικές κυτταρικές λειτουργίες και να επέμβει σε φυσιολογικές, βιοχημικές και μοριακές διεργασίες του φυτού. Η συνεξέλιξη έγκειται στο γεγονός ότι σε κάθε νέο μηχανισμό άμυνας του φυτού, το παθογόνο εξελίσσει νέες μορφές προκειμένου να ανακτήσει την παθογόνο δράση ως προς τον συγκεκριμένο ξενιστή. Αυτοί οι μηχανισμοί αναγνώρισης μεταξύ φυτού και παθογόνου έχουν συντελέσει στη δημιουργία εξειδικευμένων μηχανισμών αλληλεπίδρασης στο σύστημα ξενιστής - παθογόνο (Agrios, 2005).

Τα φυτά αμύνονται έναντι των παθογόνων οργανισμών και καταναλωτών σε δύο επίπεδα που περιλαμβάνουν αμυντικές δομές αλλά και μία πληθώρα τοξικών ενώσεων που αποτρέπει ή εξοντώνει τους εισβολείς. Το οπλοστάσιο των φυτών περιλαμβάνει τόσο συστατικούς (μόνιμους) όσο και επαγόμενους μηχανισμούς άμυνας. Στο πρώτο επίπεδο παρεμβάλλεται η συστατική προϋπάρχουσα άμυνα, ενώ στο δεύτερο επίπεδο ενεργοποιείται η επαγόμενη άμυνα. Ο συνδυασμός αυτών των δύο παρουσιάζει εξαιρετική πολυπλοκότητα και ποικίλει ως προς την ενεργοποίηση του στα διάφορα συστήματα ξενιστή – παθογόνου. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η απόκριση μεταβάλλεται ανάλογα με την ηλικία του φυτού, το είδος του φυτικού οργάνου και ιστού που προσβάλλεται, τη θρεπτική κατάσταση του φυτού και τις εκάστοτε αγροκλιματικές συνθήκες (Agrios, 2005) (Εικόνα 1.3).

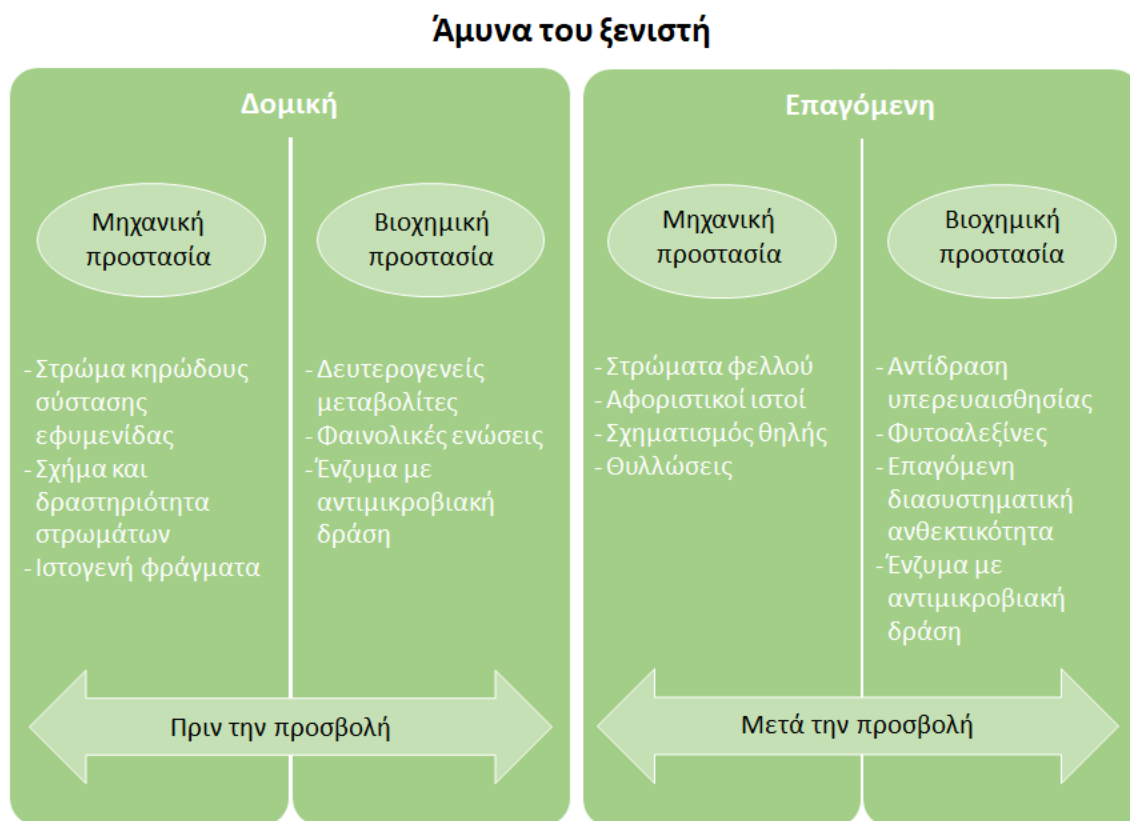


Εικόνα 1.3 Απόκριση των φυτών στις καταπονήσεις. Η αλληλεπίδραση μεταξύ φυτού και παράγοντα καταπόνησης εξαρτάται από πρόσθετους παράγοντες που σχετίζονται τόσο με το φυτό όσο και με την καταπόνηση.

Η συστατική προϋπάρχουσα άμυνα αφορά σε ένα σύνολο αμυντικών μηχανισμών οι οποίοι εξασφαλίζουν τη μόνιμη προστασία των ιστών και κυττάρων (Εικόνα 1.4). Συγκεκριμένα, οι δομικοί ή προϋπάρχοντες μηχανισμοί λειτουργούν ως φυσικό εμπόδιο που αποτρέπουν την είσοδο και εξάπλωση των παθογόνων στο φυτό (Agrios, 2005). Η μόλυνση εμποδίζεται μέσω κάποιων ανατομικών χαρακτηριστικών και με πληθώρα βιοχημικών ουσιών που παράγονται από τα φυτά. Η επιφάνεια του φυτού περιλαμβάνει προστατευτικά στρώματα (επίχρισμα κήρου και επιδερμικά τριχίδια) στα κυτταρικά τοιχώματα και τους ιστούς του φυτού. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο παίζει η δομή και η λειτουργία των φυσικών ανοιγμάτων των φυτών, όπως είναι το πάχος της εφυμενίδας και της ενδοδερμίδας (Τζάμος 2007, Agrios 2005). Ωστόσο, περισσότερη ανθεκτικότητα στα φυτά προσδίδουν οι ουσίες που παράγονται. Η παθητική βιοχημική άμυνα των φυτών σχετίζεται με την σύνθεση και έκκριση αντιμικροβιακών ουσιών (τοξικοί δευτερογενείς μεταβολίτες). Οι μεταβολίτες αυτοί απαντώνται συνήθως στα χυμοτόπια των κυττάρων καθώς και σε αδένες, ρητινοφόρους αγωγούς και γαλακτοφόρους σωλήνες. Από την άλλη, ακόμη και η απουσία ορισμένων θρεπτικών στοιχείων στο φυτό, μπορεί να αποτελέσει ανασταλτικό παράγοντα για την ανάπτυξη και επιβίωση ενός ετερότροφου παθογόνου (Agrios, 2005).

Η ανθεκτικότητα που προέρχεται από τις αντιδράσεις του ξενιστή, οι οποίες ενεργοποιούνται μετά τη μόλυνσή του από το παθογόνο και εξελίσσονται σε συνάρτηση με αυτό, καλείται ως επαγόμενος μηχανισμός άμυνας. Αυτή η άμυνα χρησιμοποιείται όταν τα φυτά βρίσκονται σε κατάσταση άμεσου κινδύνου και αφορά σε βιοχημικούς κυρίως μηχανισμούς (Εικόνα 1.4). Ωστόσο, προϋπόθεση για την ενεργοποίηση των επαγόμενων μηχανισμών άμυνας είναι η έγκαιρη αντίληψη του ερεθίσματος μέσω ενός συστήματος επιτήρησης. Η προστασία του φυτού επιτυγχάνεται με την ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος (εναπόθεσης λιγνίνης, δημιουργία στρωμάτων φελλών, τυλώσεων ή θηλίδων). Επιπροσθέτως, μπορεί να περιλαμβάνει τη βιοσύνθεση φυτοαλεξινών, την παραγωγή οξειδωτικών και υδρολυτικών ενζύμων και τη σύνθεση ενεργών μορφών οξυγόνου (Τζάμος, 2007). Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές ότι, λόγω της αλληλεπίδρασης των εμπλεκόμενων βιοχημικών μονοπατιών, ορισμένοι από τους επαγόμενους μηχανισμούς άμυνας μπορεί να επιδρούν αρνητικά σε βιοχημικά μονοπάτια που εξειδικεύονται για την καταπολέμηση άλλων

εχθρών για το φυτό (Agrawal et al.,1999, Kunkel et al.,2002). Τέλος, είναι αξιοσημείωτο ότι η συστατική και επαγόμενη άμυνα δεν παρουσιάζουν πάντα διακριτά όρια, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις στα σχετικά μονοπάτια άμυνας.

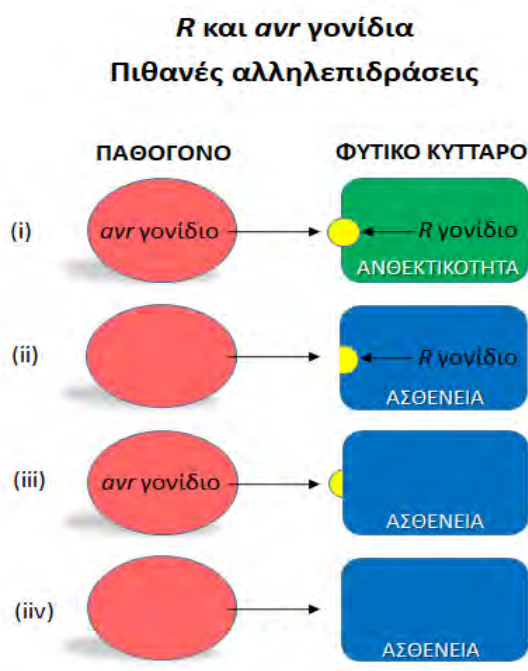


Εικόνα 1.4 Οδοί άμυνας των φυτών-ξενιστών. Τα φυτά αμύνονται έναντι των καταπονήσεων σε δύο επίπεδα που αφορούν στη συστατική προϋπάρχουσα άμυνα και στην επαγόμενη άμυνα που ενεργοποιείται κατόπιν της προσβολής.

Η επαγωγή μερικών ή όλων των παραπάνω μηχανισμών άμυνας παρατηρείται στις περισσότερες αλληλεπιδράσεις που οδηγούν σε εκδήλωση ανθεκτικότητας, που συνήθως, αλλά όχι πάντα, συνοδεύεται από την αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response, HR). Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι οι μηχανισμοί αυτοί λειτουργούν στα ανθεκτικά κατά περίπτωση φυτά ή παραμένουν σε λανθάνουσα κατάσταση και διεγείρονται από βιοτικούς ή αβιοτικούς παράγοντες (Τζάμος, 2007, σελ. 398).

1.3. Σχέση *R* – *avr*

Τα γονίδια ανθεκτικότητας (*R*) παρουσιάζουν σημαντική εξειδίκευση ως προς το παθογόνο με το οποίο αλληλεπιδρούν. Αντιστοίχως, στη φύση υπάρχει μεγάλη ποικιλία γονιδίων αμολυσματικότητας (*avr*) γι' αυτήν την εξειδικευμένη σχέση φυτού – παθογόνου. Παρά την εξειδίκευση σε επίπεδο αλληλεπίδρασης φυτού – παθογόνου, το κοινό σημείο στην άμυνα που εκδηλώνουν τα φυτά εντοπίζεται στους μοριακούς μηχανισμούς που επάγουν την αντίδραση ανθεκτικότητας. Ο γονότυπος του παθογόνου είναι ο παράγοντας που ενεργοποιεί τη λειτουργία του αλληλεπιδρώντος γονιδίου ανθεκτικότητας *R* του φυτού, ενώ ο μηχανισμός άμυνας από μέρους του φυτού θα ενεργοποιηθεί μόνον εάν το παθογόνο φέρει το κατάλληλο γονίδιο *avr* (Εικόνα 1.5). Οι πρωτογενείς διεργασίες στα φυτικά κύτταρα ξεκινούν όταν τα γονίδια του παθογόνου (*avr*) κωδικοποιούν ειδικές αλληλουχίες που ονομάζονται διεγέρτες (elicitors). Οι τελευταίοι είναι ουσίες που παράγονται από το παθογόνο και επάγουν την αντίδραση υπερευαισθησίας, καθώς αναγνωρίζονται από υποδοχείς που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *R* (Αθανασούλη, 2009).



Εικόνα 1.5 Γονίδια και αλληλεπιδράσεις φυτών – παθογόνων. Εάν το γονίδιο *avr* του παθογόνου, που κωδικεύει ένα διεγέρτη, αναγνωρίζεται από το γονίδιο *R* του φυτού, που κωδικεύει έναν υποδοχέα, επιτυγχάνεται πρόσδεση διεγέρτη-υποδοχέα που οδηγεί στην εκδήλωση ανθεκτικότητας. Σε όλες τις άλλες αλληλεπιδράσεις, εκδηλώνεται ασθένεια.

Η απομόνωση του πρώτου *avr* γονιδίου αφορούσε το *avrA* από το *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Staskawicz et al., 1984), ωστόσο δεν ήταν ακόμη γνωστό ότι το αντίστοιχο προϊόν κωδικοποιεί εκκριτικό υπόστρωμα. Είναι πλέον γνωστό ότι οι πρωτεΐνες-τελεστές μεταφέρονται στα ευκαρυωτικά κύτταρα και δρουν στο εσωτερικό του κυττάρου - ξενιστή. Στα παθογόνα βακτήρια, οι πρωτεΐνες - τελεστές επηρεάζουν το μεταβολισμό και το αμυντικό σύστημα του κυττάρου - ξενιστή. Οι διεγέρτες αυτοί βρίσκονται πάνω ή κοντά στην επιφάνεια του παθογόνου που προκαλεί την αντίδραση υπερευαισθησίας, και μπορεί να είναι γενικοί, όπως η φλατζελίνη, οι λιποπολυσακχαρίτες, η πεπτιδογλυκάνη, οι χιτίνες, οι πρωτεΐνες κ.α. (Hofius et al., 2007) ή εξειδικευμένοι ως προς τη φυλή του παθογόνου, όπως οι ελιστίνες, οι χαρπίνες κ.α. (*avr*) (Τζάμος, 2007, σελ 415, 416).

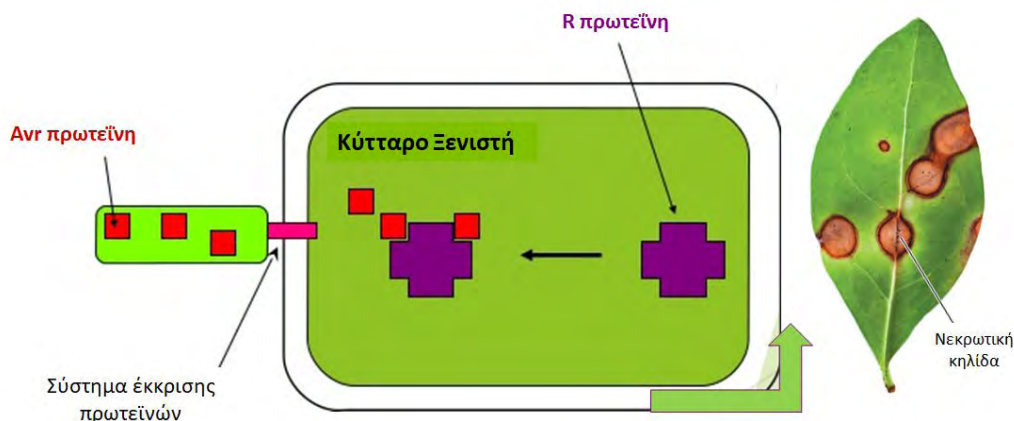
1.4. Αντίδραση Υπερευαισθησίας

Πριν από περίπου έναν αιώνα, διατυπώθηκε για πρώτη φορά, από τον Stacman η Αντίδραση Υπερευαισθησίας (AY) – HR (Hypersensitive Response). Κατά τη μελέτη της σκωρίασης των σιτηρών, ορίστηκε ως αντίδραση υπερευαισθησίας η ταχύτατη νέκρωση κυττάρων που λαμβάνει χώρα σε ανθεκτικές ποικιλίες έπειτα από μόλυνση με τους εν λόγω μύκητες (Τζάμος, 2007, σελ. 395).

Η αντίδραση υπερευαισθησίας AY (Hypersensitive Response, HN), αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών και αναφέρεται χαρακτηριστικά ως ένας προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (Programmed Cell Death, PCD). Σκοπός της AY είναι η απομόνωση του παθογόνου στο σημείο αρχικής προσβολής και η παρεμπόδιση πολλαπλασιασμού και μετακίνησης του παθογόνου. με αποτέλεσμα την αποφυγή διασυστηματικής μόλυνσης και εδραίωσης της ασθένειας (Agríos, 2005, Heath, 1998).

Σε κυτταρικό επίπεδο, ως επακόλουθο της επερχόμενης μόλυνσης ενεργοποιείται η αντίδραση υπερευαισθησίας με εμφανή σημάδια σε μακροσκοπικό επίπεδο (Εικόνα 1.6). Τα φυτικά κύτταρα είτε μεμονωμένα είτε σε ομάδες αντιδρούν πρωτογενώς με μια ιδιόμορφη "αυτοκτονία", με σκοπό να απομονωθεί το παθογόνο στο σημείο εισβολής/διείσδυσης. Αυτή η ιδιότυπη αντίδραση που παρουσιάζουν τα φυτικά κύτταρα στοχεύει στην παρεμπόδιση της αναπαραγωγής, της προέλασης και μετακίνησης του παθογόνου παράγοντα, οπότε

αποφεύγεται η εκδήλωση της ασθένειας. Ωστόσο, αναφέρεται ότι τα φυτοπαθογόνα βακτήρια, και όχι τα σαπροφυτικά συγγενικά είδη τους, έχουν την ικανότητα να προκαλούν μια τέτοιου είδους αντίδραση στο φυτό ξενιστή τους (Tampakaki et al., 2010), γεγονός που υποδεικνύει μια ακόμη πιο εξειδικευμένη αλληλεπίδραση των δύο οργανισμών.



Εικόνα 1.6 Αλληλεπίδραση της προερχόμενης από το παθογόνο *Avr* πρωτεΐνης με την *R* πρωτεΐνη του φυτού ξενιστή και ενεργοποίηση της αντίδρασης υπερευαισθησίας. Η τελευταία, οδηγεί σε ταχύτατη νέκρωση των κυττάρων στο σημείο προσβολής.

Σε βιοχημικό επίπεδο, πριν την έναρξη της αντίδρασης υπερευαισθησίας, είναι απαραίτητη η σύνθεση και η απελευθέρωση των διεγερτών της ΑΥ (Hammond-Kosack and Jones, 2000). Στη συνέχεια, παρατηρείται διαρροή ηλεκτρολυτών από τα φυτικά κύτταρα, διακοπή της φυσιολογικής ανταλλαγής ιόντων K^+/H^+ , εισροή ιόντων Ca^{+2} , παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου και συσσώρευση φυτοαλεξινών. Οι αμέσως επόμενες διεργασίες που πραγματοποιούνται εξαιτίας της αλληλεπίδρασης παθογόνου - φυτού είναι η παραγωγή φαινολικών ουσιών και αντιμικροβιακών παραγόντων. Το τελικό αποτέλεσμα αφορά σε βλάβη της ημιπερατότητας των μεμβρανών της H^+ + ΑΤΡάσης και νέκρωση των φυτικών κυττάρων (Hammond-Kosack and Jones, 2000). Οι διεργασίες ολοκληρώνονται έχοντας ως αποτέλεσμα την πρόληψη δημιουργίας αποικιών, πολλαπλασιασμού και απορρόφησης θρεπτικών στοιχείων του παθογόνου από το φυτό ξενιστή (Hueck, 1998).

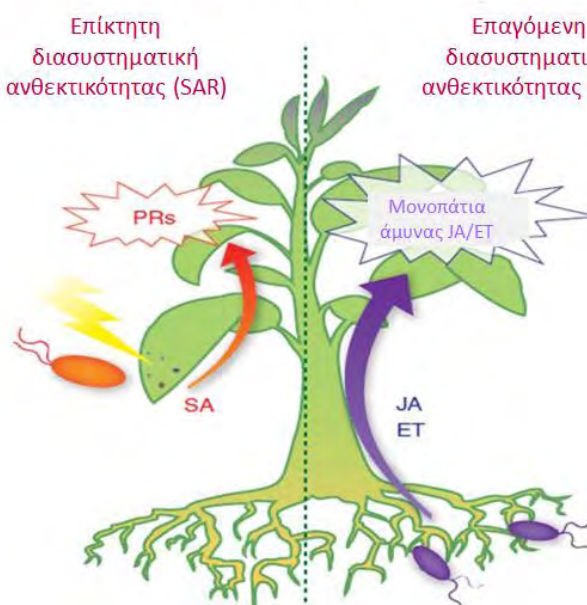
Η επίκτητη ή επαγόμενη διασυστηματική αντοχή, είναι η βιολογική, βιοχημική ή χημική διέγερση λανθανόντων μηχανισμών αντοχής, ώστε ένα φυτό ευπαθές σε ένα σύστημα ξενιστή-παθογόνου, να καθίσταται ανθεκτικό στο ίδιο αυτό σύστημα. Έχει επικρατήσει η "διασυστηματική αντοχή" να αποδίδεται χάριν συντομίας και με το γενικό όρο "Ανοσοποίηση" (Τζάμος, 2007). Η επίκτητη διασυστηματική αντοχή (Systemic Acquired

Resistance, SAR), ενεργοποιείται κατόπιν μόλυνσης τον ξενιστή με ένα παθογόνο. Αρχικά, η επαγόμενη ανθεκτικότητα συγκεντρώνεται γύρω από το σημείο της νέκρωσης που προκαλείται από το παθογόνο ή το χημικό παράγοντα, οπότε καλείται τοπική επίκτητη αντοχή. Ακολούθως η ανθεκτικότητα μεταδίδεται διασυστηματικά και αναπτύσσεται σε απομακρυσμένα, μη προσβεβλημένα μέρη του φυτού οπότε καλείται επίκτητη διασυστηματική αντοχή (Agrios, 2005). Από την άλλη, τα φυτά διαθέτουν και επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (Induced Systemic Resistance, ISR) ως μηχανισμό αντοχής τους, όταν επιτυγχάνεται με βιολογικούς παράγοντες που δεν προκαλούν τοπική νέκρωση π.χ. ριζοβακτήρια.

1.5. Βιοχημικά μονοπάτια

Τα κύρια γνωστά βιοχημικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη μεταφορά του σήματος για την ενεργοποίηση της άμυνας του φυτού έναντι κάποιου παθογόνου, προσδίδοντας ανθεκτικότητα στα φυτά ξενιστές, αφορούν στη βιοσύνθεση του σαλικυλικού οξέος, του ιασημονικού οξέος, του αιθυλενίου και του αμπισισικού οξέος (Εικόνα 1.7).

Επαγόμενη ανθεκτικότητα - Βιοχημικά μονοπάτια άμυνας



Εικόνα 1.7 Βιοχημικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη μεταφορά του σήματος και την ενεργοποίηση της άμυνας του φυτού.

1.6.1 Το μονοπάτι Βιοσύνθεσης Σαλικυλικού Οξέος

Χημικά, το σαλικυλικό ή ορθο-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ (SA) ανήκει στην ποικιλόμορφη ομάδα των φαινολικών ενώσεων των φυτών. Το SA απαντάται σε ολόκληρο το βασίλειο των φυτών και κατατάσσεται στην ομάδα των φυτικών ορμονών. Τα υψηλότερα επίπεδα SA βρέθηκαν στις ταξιανθίες των θερμογόνων φυτών και σε φυτά μολυσμένα με νεκρωτικά παθογόνα (Raskin 1992, Hayat and Ahmad 2007). Είναι ευρέως αποδεκτό ότι το SA είναι ένα φυσικό παράγωγο του κινναμωμικού οξέος, ενός ενδιάμεσου προϊόντος στη βιοσυνθετική οδό του σικιμικού οξέος, που εμπλέκεται στη σύνθεση των φαινολικών ενώσεων. Ωστόσο, δύο είναι τα κύρια βιοχημικά μονοπάτια σύνθεσής του. Το πρώτο είναι αυτό της αποκαρβοξυλίωσης της πλευρικής αλυσίδας του κινναμωμικού οξέος, ενώ το δεύτερο της υδροξυλίωσης του κινναμωμικού οξέος, ακολουθούμενη από την αποκαρβοξυλίωσή του σε σαλικυλικό οξύ (Hayat and Ahmad 2007). Το σαλικυλικό οξύ μπορεί να μετακινηθεί ταχέως από το σημείο της αρχικής εφαρμογής ή συνθέσεώς του σε απομακρυσμένους φυτικούς ιστούς (Τζάμος, 2007, σελ 404).

Το σαλικυλικό οξύ φαίνεται να κινείται διά μέσου του φλοιώματος, από το φύλλωμα προς τα υπόλοιπα μέρη του φυτού, πρώτα στα κατώτερα μέρη του φυτού και έπειτα στα ανώτερα. Επιπλέον, στις περιπτώσεις προσβολής από παθογόνα, η συγκέντρωση του σαλικυλικού οξέος αυξάνεται, τόσο τοπικά, όσο και διασυστηματικά. Μάλιστα, η συγκέντρωσή του στον ηθμό αυξάνεται πριν ακόμη εκδηλωθεί η διασυστηματική ανθεκτικότητα. Μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το SA, το οποίο είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση της επίκτητης ανοχής μετά από προσβολή, μπορεί να κινηθεί τάχιστα στον αποπλάστη από το φλοιώμα, με εξάπλωσή του πρώτα στο φλοιώδες παρέγχυμα και έπειτα στην επιδερμίδα, η οποία αποτελεί τον πλέον ευπαθή ιστό, αφού είναι το μέρος εκείνο του φυτού που έρχεται συχνότερα σε επαφή με παθογόνα (Ohashi et al., 2004).

Το σαλικυλικό οξύ εμφανίζει πολλαπλούς ρόλους στη φυσιολογία του φυτού. Η πρώτη φυσιολογική αντίδραση που αποδόθηκε στο σαλικυλικό οξύ ήταν αυτή της επαγωγής της άνθισης σε φυτά καπνού (Lee και Skoog, 1965, Eberhard et al., 1989). Ακόμη, επιδρά ως ρυθμιστής αύξησης στην ανάπτυξη του φυτού, κυρίως στο ύψος, την ρίζα και την ξηρά ουσία (Arberg, 1981). Επίσης, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε σπόρους σίτου παρατηρήθηκε

αύξηση στον αριθμό των φύλλων, αλλά και τη νωπή και ξηρή μάζα του φυτού, αντιστρέφοντας τα αποτελέσματα του αμπισικού οξέος (ABA) στην πτώση των φύλλων (Hayat et al., 2005). Μια ακόμη θετική επίδραση του σαλικυλικού οξέος παρουσιάζεται στη φωτοσύνθεση με αύξηση της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη και καροτενοειδή έως 20%, καθώς και την αύξηση της αποδοτικότητας χρήσης του νερού (WUE). Θετική είναι και η επίδρασή του στον μεταβολισμό των νιτρικών (Hayat et al. 2005).

Τα φυτά έχουν εξελίξει το ανοσοποιητικό τους σύστημα, με το οποίο αναγνωρίζουν ξένα μόρια ή σήματα από τα τραυματισμένα κύτταρα και ανταποκρίνονται σε αυτά ενεργοποιώντας αποτελεσματική ανοσολογική απόκριση. Στο πλαίσιο αυτό παίρνει μέρος το σαλικυλικό οξύ, που λειτουργεί ως σήμα, αλληλεπιδρώντας παράλληλα και με άλλες φυτοορμόνες (cross – talk) (Bari and Jones 2009, Pieterse et al. 2009).

Σε φυτά καπνού, ορισμένες αντιδράσεις άμυνας, όπως η έκφραση των PR (pathogenic related) γονιδίων, προκαλούνται αμέσως μετά από εξωγενή εφαρμογή SA. Είναι ενδιαφέρον ότι η ικανότητα του σαλικυλικού οξέος να ενισχύει την αντοχή στις ασθένειες φαίνεται να σχετίζεται με τουλάχιστον δύο οδούς. Η πρώτη ρυθμίζει την αντοχή σε διάφορους ιούς κι είναι ευαίσθητη στον αναστολέα AOX (salicyl hydroxyamic acid, SHAM). Από την άλλη, η οδός που προσδίδει αντοχή σε παθογόνα βακτήρια και μύκητες ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου PR-1. Είναι απαραίτητο να τονιστεί ότι ο ρόλος του SA αναφορικά με ορισμένες αποκρίσεις, όπως η παραγωγή ROS, η ενεργοποίηση υπερευαισθησίας, ο κυτταρικός θάνατος και η επαγωγή ορισμένων γονιδίων άμυνας, είναι αμελητέος αφού τις ελέγχει και τις ενεργοποιεί ελάχιστα, αν όχι καθόλου. Ωστόσο, το SA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο όταν παρέχεται πριν ή κατά τη στιγμή της μόλυνσης των παθογόνων ή όταν εφαρμόζεται θεραπεία με διεγέρτες (βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες/ενώσεις που προκαλούν διάφορες αμυντικές αντιδράσεις), κι αυτές οι αποκρίσεις παράγονται με μεγαλύτερο ρυθμό (Dempsey and Klessig 2003). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εξωγενής εφαρμογή του SA στα φύλλα των φυτών *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, σε συγκέντρωση 10^{-5} . Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εφαρμογή του μειώνει τα καταστρεπτικά αποτελέσματα της υψηλής συγκέντρωσης αλάτων στην αύξηση των φυτών και πως επιταχύνει την αναχαίτιση της διαδικασίας της αύξησης (Idrees et al., 2011).

Συμπερασματικά, θα λέγαμε ότι το SA, όταν εφαρμόζεται εξωγενώς, σε μη τοξικά επίπεδα για τους φυτικούς οργανισμούς και στο κατάλληλο στάδιο της ανάπτυξής τους, προσδίδει ανθεκτικότητα στις καταπονήσεις δρώντας ως διεγέρτης του αμυντικού συστήματος.

1.6.2 Το μονοπάτι Βιοσύνθεσης Ιασμονικού Οξέος

Η ανακάλυψη του ιασμονικού οξέος (Jasmonic acid, JA) πραγματοποιήθηκε πριν από 40 χρόνια (Davies 2004). Το ιασμονικό οξύ (jasmonate acid, JA), όπως και ο μεθυλιωμένος εστέρας του (methyl jasmonate), παράγονται από το λινολενικό οξύ, ανήκουν στις κυκλοπεντανόνες, δηλαδή στα λιπαρά οξέα (Τζάμος, 2007, σελ 405). Οι παραπάνω ουσίες, επάγουν την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, και παρεμβάλλονται σε διάφορα βιολογικά συστήματα, όπως στις διεργασίες αύξησης και ανάπτυξης του φυτού (αποκοπή μίσχων, βλάστηση γύρης, αύξηση ρίζας, γήρανση, ωρίμανση των καρπών, αντίδραση σε τραυματισμό και άλλες αβιοτικές καταπονήσεις). Μάλιστα, έχει βρεθεί ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στις επαγόμενες αντιδράσεις των φυτών, τόσο σε βιοτικές (προσβολή από έντομα, 38 παθογόνα, συμπεριλαμβανομένου μύκητες, βακτήρια καθώς και φυτοφάγα ζώα) όσο και σε αβιοτικές καταπονήσεις (ξηρασία, χαμηλές θερμοκρασίες και αλατότητα) (Turner κ.ά., 2002; Πασπάτης, 1998). Επίσης, σχετίζονται με τη σύνθεση και συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών οι οποίοι δρουν ως ελκυστικές ουσίες, αναστολείς, δηλητήρια και αλληλοπαθητικές ουσίες (όπως τερπένια, αλκαλοειδή, φαινολικές ενώσεις, ανθοκυάνες, φλαβονοειδή, κουμαρίνη κ.ά.), και οι οποίοι αποτελούν επίσης μέρος της άμυνας των φυτών (Πασπάτης 1998).

Έκτοτε, πραγματοποιήθηκαν έρευνες με σκοπό την κατανόηση της βιοσύνθεσης και της φυσιολογικής λειτουργίας των ενώσεων αυτών. Από τα πρώτα κιάλας ευρήματα προέκυψαν ενδείξεις για τη βιοσυνθετική οδό του JA (Davies 2004). Τα ιασμονικά ανήκουν στην οικογένεια των οξυγονωμένων παραγώγων λιπαρών οξέων, που συλλογικά ονομάζονται οξυλιφίνες, τα οποία παράγονται μέσω του μεταβολισμού οξείδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Στα φυτά, οι οξυγονούχες ενώσεις που προέρχονται κυρίως από το C18 α-λινολενικό οξύ (οκταδεκατριενοϊκό οξύ, 18:3) ελέγχουν ένα εξίσου ευρύ φάσμα των διαδικασιών που σχετίζονται με την ανάπτυξη και την άμυνα (Davies 2004). Το ιασμονικό οξύ με τη δράση του ενζύμου μεθυλοτρανσφεράση (JAcarboxyl-methyltransferase, JMT) μετατρέπεται στον αντίστοιχο πτητικό μεθυλεστέρα (MeJA). Επιπροσθέτως, ένας μεγάλος αριθμός παραγώγων μπορεί να σχηματισθεί από το ιασμονικό οξύ με υδροξυλίωση, γλυκοζυλίωση και με σχηματισμό συμπλόκων με αμινοξέα και σάκχαρα. Πολλά από τα παράγωγα αυτά εκδηλώνουν βιολογική δράση. Παράγωγα σχηματίζονται και από τις ενδιάμεσες ενώσεις της βιοσυνθετικής οδού, όπως είναι το λινολενικό οξύ, το 13-HPOT κ.ά. (Mueller 1997).

Στις αρχές του 1990, ενδιαφέρον παρουσίασε η ανακάλυψη ότι τα ιασμονικά δρουν ως ισχυρά σήματα για την έκφραση των αμυντικών αναστολέων πρωτεάσης για τη λειτουργία του ορμονικά ενεργού JA στην άμυνα των φυτών. Σημαντικός αριθμός ερευνών αποδεικνύουν ότι η εξωγενής εφαρμογή JA ασκεί επίδραση σε ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών διεργασιών (Davies 2004). Ωστόσο, η εφαρμογή του JA δεν συνδέεται άρρηκτα με την εκδήλωση ανθεκτικότητας, καθώς ούτε και με την εκδήλωση ευαισθησίας. Αυτό απορρέει από τα αντιφατικά αποτελέσματα πολλών ερευνών. Ωστόσο, όλες οι μελέτες συνηγορούν στην πολύπλευρη δράση του JA και των εμπλεκόμενων σηματοδοτικών μονοπατιών στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και νηματωδών (Yan and Daoxin, 2015). Πιο συγκεκριμένα, σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε φυτά ντομάτας και ρυζιού, εφαρμόστηκε εξωγενώς μεθυλιωμένο ιασμονικό οξύ, η εφαρμογή προκάλεσε ανθεκτικότητα έναντι των κομβωδών νηματωδών (Cooper et al., 2005; Nahar et al., 2011). Εν αντιθέσει, σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε στο είδος *Arabidopsis*, η μεταλλαγή *lox4* συνδέθηκε με επαγωγή της βιοσύνθεσης JA και οδήγησε σε ενίσχυση της ευαισθησίας τόσο στους κομβώδεις όσο και στους κυστώδεις νηματώδεις (Ozalvo et al., 2014; Yan and Daoxin, 2015).

1.6.3 Το Μονοπάτι Βιοσύνθεσης Αιθυλενίου

Το αιθυλένιο (ET), από χημική άποψη είναι ένας αέριος, ακόρεστος υδρογονάνθρακας που αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στις αρχές τον εικοστού αιώνα. Από όλες τις γνωστές ορμόνες έχει την πιο απλή δομή ($\text{CH}_2=\text{CH}_2$) και παίζει σημαντικό ρόλο στις φυσιολογικές διεργασίες του φυτού. Αποτελεί ένα κοινό μεταβολίτη των περισσότερων ανώτερων φυτών και μικροοργανισμών (Hag, 1968; Lynch, 1972; Pimose, 1979). Συντίθεται από το αμινοξύ μεθειονίνη, μέσω δύο ενδιάμεσων μεταβολικών προϊόντων (αδενοσυλομεθειονίνη και αμινοκυκλοπροπανο-καρβοξυλικό οξύ) (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010, σελ.740). Το αιθυλένιο απελευθερώνεται στο περιβάλλον από τούς μεσοκυττάρους χώρους των κυττάρων όπου βρίσκεται σε ισορροπία με την συγκέντρωση του αιθυλενίου που υπάρχει διαλυμένο στο κυτόπλασμα (Fiserova et al., 2008).

Στους φυτικούς οργανισμούς, το αιθυλένιο συνδέεται με μια σειρά διεργασιών, καθώς είναι παρεμποδιστής ανάπτυξης, είναι υπεύθυνο για την ωρίμανση των φρούτων, για τη φυσιολογική και παθολογική φυλλόπτωση, για την έναρξη της άνθησης και τη ρύθμιση εξωτερικών ερεθισμάτων όπως το αβιοτικό και βιοτικό στρες (Boller, 1991; Abeles et al.,

1992; Chaguό, 2010). Επιπλέον, συμβάλλει στην ωρίμανση των καρπών, τη γήρανση φύλλων και ανθέων, την πλευρική επέκταση των κυττάρων στους βλαστούς των χερσαίων φυτών και την επιμήκυνση κυττάρων στα βυθισμένα στο νερό φυτά (Μανέτας, 2005, σελ 249). Στην πράξη το αιθυλένιο θεωρείται πολύ σημαντικό στη μετασυλλεκτική φάση των καρπών, καθώς αυξάνει το μαλάκωμα και το χρώμα τους (Tudrynski and Sharon, 2002). Μία ακόμη σημαντική ιδιότητα του αιθυλενίου είναι ότι αυξάνεται η παραγωγή του, κατά την μόλυνση από διάφορα παθογόνα, ενισχύοντας την άμυνα των φυτών (Abele et al., 1992; Mauch et al., 1984; Cohn και Martin, 2005).

Σε επίπεδο πρόκλησης ανθεκτικότητας στα φυτά, η παρουσία του αιθυλενίου συνδέεται με μεταβολές σε επίπεδο δομής που συχνά οδηγούν σε περισσότερο ανθεκτικά κυτταρικά τοιχώματα, κυρίως μέσω εναπόθεσης λιγνίνης (Τζάμος, 2007, σελ 406). Κατά τις αλληλεπιδράσεις φυτού-παθογόνου, το αιθυλένιο επάγει ανθεκτικότητα έναντι ορισμένων παθογόνων και ευαισθησία έναντι άλλων (Tampakaki et al., 2009, σελ 666). Σε αμπελώνες, η εφαρμογή αιθυλενίου επάγει μηχανισμούς άμυνας τον φυτού εναντίον του μύκητα *Erysiphe necator* (Belhady et al., 2008). Από την άλλη, βρέθηκε ότι σε φρούτα μπανάνας που είχαν μολυνθεί με το βακτήριο *Ralstonia solanacearum* η περιεκτικότητα σε αιθυλένιο αυξήθηκε αναλογικά με την ανάπτυξη των συμπτωμάτων ενώ δεν ανιχνεύτηκε αιθυλένιο σε υγιείς καρπούς (Agrios, 2005).

1.6.4 Το Μονοπάτι Βιοσύνθεσης Αμψισικού Οξέος

Το αμψισικό οξύ (abscisic acid, ABA) ανήκει στις φυτικές ορμόνες και είναι πολύ διαδεδομένο στο φυτικό βασίλειο, καθώς συμμετέχει σε πολλές διεργασίες (Καραταγλής, 1999). Το αμψισικό οξύ είναι μια ένωση που περιέχει 15 άτομα άνθρακα και κατατάσσεται στην ομάδα των σεσκιτερπενοειδών (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2010, σελ.737). Η βιοσύνθεση του πραγματοποιείται με δύο τρόπους και ειδικότερα, α) αυτό του πυροφωσφορικού φαρνεσυλίου και β) αυτό της ξανθοζίνης, η οποία έπειτα μετατρέπεται σε αλδεύδη του αμψισικού οξέος (Καραταγλής, 1999).

Το αμψισικό οξύ παίζει σημαντικό ρόλο στην γήρανση των φυτικών ιστών και προκαλεί απόπτωση των φύλλων και των καρπών (Καραταγλής, 1999). Ένα ακόμη σημαντικό σημείο που επεμβαίνει το ABA στα φυτά φαίνεται πως σχετίζεται με το σήμα που λαμβάνουν ώστε να κλείσουν τα στόματα υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης (Μανέτας, 2005, σελ. 150, 249). Επίσης, η διακοπή της μεταφοράς φωτοσυνθετικών προϊόντων στα

φυτικά όργανα αποδίδεται στο ABA. Τέλος, η σύνθεση του ABA συμβάλει και στη ρύθμιση των επιπέδων RNAs που κωδικοποιούν αποθησαυριστικές πρωτεΐνες που χρησιμεύουν στη βλάστηση των σπόρων (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2010, σελ. 739).

Μια σειρά μελετών έχει πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια με σκοπό την αποσαφήνιση της διαφοροποίησης της επίδρασης του ABA αναλόγως με το αν παράγεται ενδογενώς ή αν εφαρμόζεται εξωτερικά. Το περιεχόμενο ABA σε κονδύλους πατάτας εμπλέκεται στη ρύθμιση του λήθαργου (Lulai et al., 2008; Suttle et al., 2013). Ωστόσο, η εξωγενής εφαρμογή ABA για την καθυστέρηση της εκβλάστησης των κονδύλων επιφέρει μόνο παροδικά αποτελέσματα και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το ABA είναι μεταβολικά ασταθές και μεταβολίζεται πολύ γρήγορα (Destefano-Beltran et al., 2006). Αναφορικά με την επίδραση του αμπισικού οξέος στην άμυνα και απόκριση των φυτών σε καταπονήσεις, έρευνες αναφέρουν ότι το αμπισικό οξύ είναι γενικά ένας αρνητικός ρυθμιστής της επαγωγής ανθεκτικότητας των φυτών. Η αρνητική αυτή δράση είναι μάλιστα ιδιαίτερα εμφανής κατά την εξωγενή εφαρμογή του φυτά, καθώς σχετίζεται με αυξημένη ευπάθεια σε παθογόνα. Το φαινόμενο αυτό προκαλείται από την εμπλοκή του αμπισικού οξέος στη διαδικασία παραγωγής σημάτων άλλων μορίων, όπως το σαλικυλικό οξύ, το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο, υπό την επόδραση βιοτικών καταπονήσεων (Mauch-Mani and Mauch, 2005).

Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση του ABA υπό συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Πιο συγκεκριμένα σε υψηλή συγκέντρωση αλάτων βρέθηκε ότι τα επίπεδα αμπισικού οξέος ήταν αυξημένα, γεγονός που αποδεικνύει ότι στις περιπτώσεις περιβαλλοντικών καταπονήσεων ενεργοποιείται η παραγωγή σήματος (ABA-mediated signalling) που οδηγεί στην καταστολή της διασυστηματικής επίκτητης ανθεκτικότητας (SAR) (Yasuda et al., 2008).

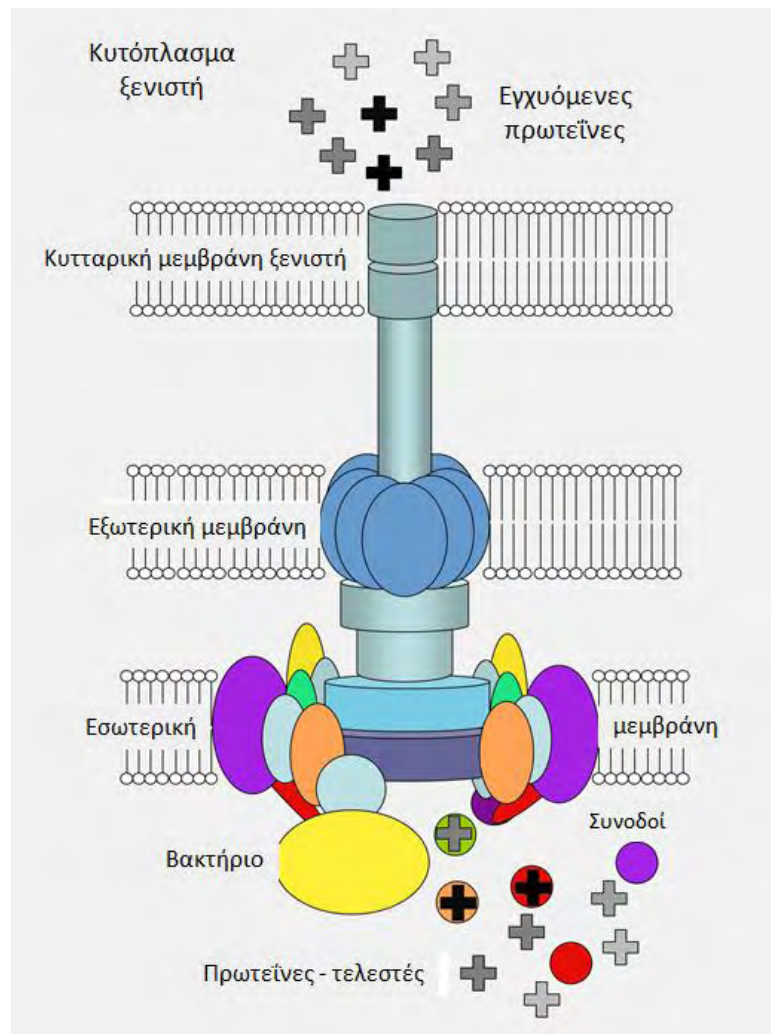
Συμπερασματικά, οι αντιδράσεις των φυτών μεταβάλλονται μεταξύ των καταπονήσεων που υποβάλλονται. Παρατηρείται ότι οι αντιδράσεις είναι ανταγωνιστικές και αποτέλεσμα του συνδυασμού της αλληλεπίδρασης όλων των βιοχημικών μονοπατιών. Οπότε είναι υψίστης σημασίας η ακριβής ρύθμιση των παραγόντων που επηρεάζουν αυτές τις αντιδράσεις (Hoffman, 2008).

1.6. Εκκριτικό σύστημα Τύπου III

Τα βακτήρια προκειμένου να εισαχθούν στα κύτταρα του ξενιστή, να τροποποιήσουν την φυσιολογία του κι εν τέλει να τον αποικίσουν, εκκρίνουν έναν μεγάλο αριθμό παραγόντων παθογένειας, όπως είναι οι πρωτεΐνες. Έτσι, έχουν αναπτυχθεί διάφορα εξειδικευμένα συστήματα έκκρισης πρωτεϊνών που εξυπηρετούν τη διαδικασία αυτή. Ειδικότερα, έχουν προσδιοριστεί έξι γενικές κατηγορίες συστημάτων έκκρισης πρωτεϊνών, τύπου I, II, III, IV, V, και VI (Μποστάκη, 2009). Η διαφοροποίηση αποδίδεται στις διαφορετικές θέσεις έκκρισης της πρωτεΐνης (Saier, 2006). Ιδιαίτερα στα Gram αρνητικά βακτήρια, όπου η έκκριση απαιτεί τη μεταφορά μακρομορίων διαμέσου της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης του βακτηριακού κυττάρου (Μποστάκη, 2009), τα εκκριτικά συστήματα συχνά κωδικοποιούνται από μεγάλα συμπλέγματα γειτονικών/ομαδοποιημένων γονιδίων τα οποία όταν βρίσκονται σε παθογόνα, ονομάζονται νησίδες παθογένειας (pathogenicity islands) (Collmer et al., 2000).

Το εκκριτικό σύστημα τύπου III (T3SS) συναντάται στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια που αλληλεπιδρούν με φυτικούς και ζωικούς ξενιστές, είτε σαν παθογόνα είτε σαν συμβιώτες με διάφορες σχέσεις αμοιβαιότητας (Cornelis, 2006; Grant et al., 2006; Mota and Cornelis, 2005). Επιπροσθέτως, είναι γνωστά και ως «injectisomes» (εγχυσώματα, ενυοσώματα) ή αλλιώς μοριακοί αγωγοί – μοριακές βελόνες. Το σχήμα τους και η ικανότητά τους να μεταφέρουν πρωτεΐνες (με επαφή των κυττάρων) και η συσχέτιση με τα συστήματα βιογένεσης και ανάπτυξης του μαστιγίου, έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι είτε τα εκκριτικά συστήματα τύπου III εξελίχθηκαν από το σύστημα του μαστιγίου ή ότι και τα δύο εξελίχθηκαν ανεξάρτητα από έναν κοινό ωστόσο προγονικό σύστημα (Cornelis, 2006; Gophua et al., 2003; McCaun and Guttman, 2008; Nguyen et al., 2000; Saier, 2004).

Σχετικά με τα δομικά χαρακτηριστικά του, αποτελείται από ένα σύνθετο προεκβάλλον σωματίδιο (injectosome), το οποίο περιέχει πάνω από 20 πρωτεΐνες. Κατά δεύτερον, αποτελείται από ένα σύνθετο δίκτυο ειδικών συνοδών (chaperones) που στοχεύουν σε πρωτεΐνες έκκρισης στην αντίθετη πλευρά του προεκβάλλοντος σωματιδίου (antechamber of the injectosome) (Portaliou et al., 2016). Πρόκειται για σύνθετες δομές που διαπερνούν την εσωτερική μεμβράνη, το περίπλασμα, την εξωτερική μεμβράνη, τον εξωκυττάριο χώρο, την κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή και, στις περιπτώσεις των φυτοπαθογόνων, το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα (Thomas and Brett Finlay, 2003) (Εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8 Τα δομικά χαρακτηριστικά του Εκκριτικού Συστήματος Τύπου 3 (T3SS). Τα κύρια συστατικά του αφορούν σε δομικές πρωτεΐνες (structural proteins), πρωτεΐνες-τελεστές (effectors) και συνοδούς (chaperons).

(Πηγή: <http://webdeptos.uma.es/genetica/tipoi/Research.html>)

Πιο αναλυτικά, τα ενυοςώματα αποτελούνται από μια σειρά βασικών δακτυλίων (βασικό σώμα) που διαπερνούν την εσωτερική και εξωτερική βακτηριακή μεμβράνη και συνδέονται με ένα κοίλο αγωγό, που συνήθως ονομάζεται βελόνα (needle) στο γένος *Yersinia*, νημάτιο (filament) στο γένος *Salmonella* ή ινίδιο (pilus) στο είδος *Pseudomonas syringae* (Thomas and Brett Finlay, 2003). Κάθε δομή έχει στην άκρη της έναν πόρο μεταφοράς (translocation pore), που εισέρχεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του κυττάρου στόχου (Blocker et al., 2008; Comelis, 2006). Τέλος, μία συντηρημένη ΑΤΡάση συνδέεται με τη βακτηριακή κυτταροπλασματική βάση του εγχυοσώματος και ενεργοποιεί τη μεταφορά των προς εξαγωγή πρωτεϊνών (Comelis, 2006).

Όσον αφορά τις λειτουργικές διαδικασίες, στα T3SS έχουν βρεθεί τρία βασικά χαρακτηριστικά. Αρχικά, οι προς εξαγωγή πρωτεΐνες δεν διαθέτουν αποκοπτόμενη αλληλουχία-σινιάλο έκκρισης. Από την άλλη, απαιτούνται βοηθητικές πρωτεΐνες (chaperones) για πολλές από τις προς εξαγωγή πρωτεΐνες, καθώς επίσης απαιτείται επαφή με το κύτταρο ξενιστή για πλήρη ενεργοποίηση του μονοπατιού έκκρισης-μεταφοράς (Ghosh, 2004; Grant et al., 2006; Hueck, 1998; Mota and Cornelis, 2005; Tseng et al., 2009).

Στα φυτοπαθογόνα βακτήρια το T3SS σχετίζεται με την παθογένεια και κωδικοποιείται από τη γονιδιακή νησίδα *hrp/hrc* (*hrp*: hypersensitive response and pathogenity genes) (Bogdanove, et al., 1996; Alfano and Collmer, 1997). Επίσης, ορισμένα φυτοπαθογόνα βακτήρια όπως τα *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P. syringae* pv. *tabaci* και *P. syringae* pv. *oryzae*, φέρουν ένα δεύτερο T3SS, εκτός από αυτό που κωδικούεται από την αρχέτυπη νησίδα παθογένειας *hrp/hrc* (Joardan et al., 2005). Οι πρωτεΐνες παθογένειας που παράγονται από το T3SS, χαρακτηρίζονται από την ιδιότητά τους να προκαλούν μόλυνση στα ευαίσθητα φυτά και αντίδραση υπερευαισθησίας στα φυτά-μη ξενιστές και σε ανθεκτικές ποικιλίες των φυτών-ξενιστών (Buttner and He, 2009).

Προκειμένου τα βακτήρια να εξουδετερώσουν τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή, υπάρχουν κάποιοι τύποι του T3SS συστήματος όπου μεταφέρονται απευθείας στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή (Saier, 2006).

Παρά το γεγονός ότι το σύστημα αυτό είναι όμοιο μόνο ως προς την κατασκευή του για όλα τα γένη των βακτηρίων, οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες διαφέρουν σημαντικά, γεγονός που αντανakλάται στο μεγάλο εύρος ασθενειών που μπορεί ένα βακτήριο να προκαλέσει σε διαφορετικούς ξενιστές (Hueck, 1998).

1.7. Χαρπίνες

Στο φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae*, το εκκριτικό σύστημα τύπου III κωδικοποιείται από τα γονίδια *hrp* (*hypersensitive reaction and pathogenecity*). Τα γονίδια *hrp* αρχικά αναγνωρίστηκαν στο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* και έχουν πλέον ταυτοποιηθεί σε όλα τα κύρια γένη φυτοπαθογόνων βακτηρίων: *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Pantoea* (Wei et al., 1992; He et al., 1993; Li et al., 2010).

Ανάλογα με το εκάστοτε φυτοπαθογόνο, η παραγωγή των χαρπινών ρυθμίζεται από την κατάλληλη διαφοροποίηση των *hrp* γονιδίων (Li, 2007, pp.31). Ωστόσο, εμφανίζουν κάποιες βασικές ομοιότητες και γι' αυτό τα γονίδια *hrp* έχουν υποδιαιρεθεί σε δύο ομάδες. Τα κριτήρια κατάταξής τους είναι η ομολογία, η γενετική οργάνωση και η ρύθμιση της μεταγραφικής τους έκφρασης. Η ομάδα I περιλαμβάνει τα *hrp/hrc1* γονίδια των γενών *Pseudomonas* και *Erwinia* (π.χ. *P. syringae* pv. *phaseolicola* και *P. syringae* pv. *syringae*, *E. amylovora* αντίστοιχα). Η ομάδα II περιλαμβάνει τα *hrp/hrc2* γονίδια των γενών *Xanthomonas* (π.χ. *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. citri*), *Ralstonia*, *Acidovorax* και *Burkholderia* (Tampakaki, 2014; Alfano and Collmer, 1997).

Μία βασική ρυθμιστική διαφορά στις δύο ομάδες συστημάτων αφορά τα οπερόνια, με τον έλεγχο να ενεργοποιείται από διαφορετικούς επαγωγείς. Στην ομάδα I ενεργοποιούνται από την πρωτεΐνη HrpL (σ^L), ένα μέλος της υποοικογένειας ECF (extra plasmic function) των παραγόντων σίγμα (Wei and Beer, 1995). Από την άλλη, στην ομάδα II ενεργοποιούνται από ένα μέλος της οικογένειας AraC στην οποία εντάσσονται οι πρωτεΐνες HrpX και HrpG που προέρχονται από το *X. campestris* και η πρωτεΐνη HrpB από το *R. solanacearum* αντίστοιχα (Genin et al, 1992; Wengelnik and Bonas, 1996; Wengelnik et al, 1999). Οι διαφορές των δύο ομάδων και η ταξινομική σχέση των αντίστοιχων βακτηρίων συμφωνεί με την υπόθεση απόκτησης του εκκριτικού συστήματος τύπου III από τα φυτοπαθογόνα μέσω οριζόντιας μεταφοράς από άγνωστους φυλογενετικούς προγόνους (Alfano and Collmer, 1996).

Οι γενετικοί τόποι της *hrp* περιλαμβάνουν μεγάλες γονιδιακές ομάδες, οι οποίες έχουν 22 – 25 γονίδια, που εντοπίζονται είτε σε χρωμοσώματα είτε σε μεγαπλασμίδια (Alfano and Collmer, 1997). Στα χρωμοσώματα εντοπίζονται στα φυτοπαθογόνα, ενώ σε μεγαπλασμίδια εντοπίζονται κάποιες εξαιρέσεις. Παράδειγμα αποτελεί το *R. solanacearum* όπου εντοπίζονται σε ένα μεγα-πλασμίδιο 2.100 kb (Boucher et al., 1986). Επιπλέον, στο παθογόνο βακτήριο *P. syringae* ομαδοποιούνται σε μια απλή χρωματοσωμική περιοχή μεγέθους 25kb που περιέχει έως και 27 γονίδια, τα οποία ομαδοποιούνται σε 7 οπερόνια (Li, 2007, pp. 27). Τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί σε φυτά καπνού ένα γονίδιο κίνησης, το οποίο πιθανώς έχει το ρόλο του υποδοχέα/μορίου δέκτη (receptor) (Schreiber and Desveaux, 2008).

Παρά τις διαφορές που παρουσιάζουν σε αμινοξικό επίπεδο, υπάρχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά που φέρουν όλες οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην ομάδα των χαρπινών. Πιο αναλυτικά είναι υδρόφιλες, θερμοσταθερές, πλούσιες σε γλυκίνες, χωρίς κυστεΐνες και εκκρίνονται σε μέσο καλλιέργειας των βακτηρίων. Είναι επίσης όξινες, εκκρίνονται σε

θρεπτικό μέσο όταν εκφράζεται το σύστημα Hrp (Li, 2007, pp.31) και είναι ευαίσθητες στην πρωτεάση.

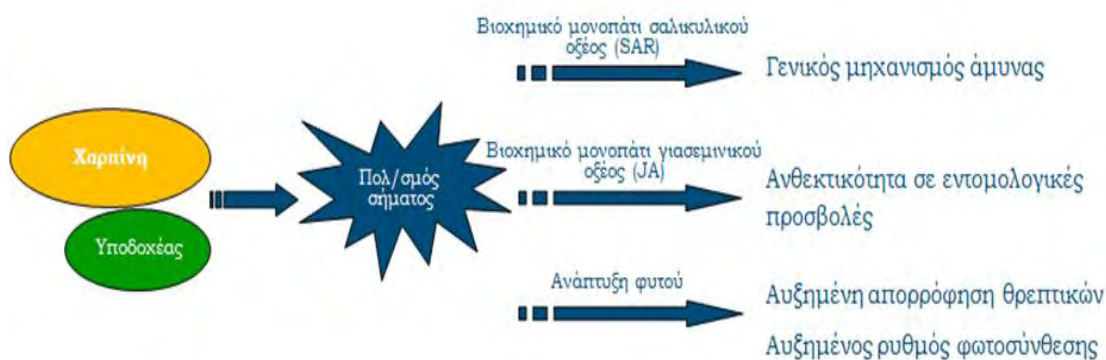
Από τις πρώτες κιόλας αναφορές σχετικά με την επίδραση των χαρπινών σε φυτά, οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες έχουν προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον καθώς έχει αναδειχθεί ο πολυδιάστατος και σύνθετος ρόλος στα φυτά. Σε επίπεδο ανάπτυξης ανθεκτικότητας, η συμβολή τους αναδεικνύεται καθοριστική και συνδέεται τόσο με βιοτικούς όσο και με αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. Όσον αφορά τους βιοτικούς παράγοντες, μελετήθηκε η ανθεκτικότητα έναντι παθογόνων μικροοργανισμών (Liu et al., 2006; Ren et al., 2006) αλλά και εντόμων (Dong et al., 2004). Από την άλλη, μελετήθηκαν οι αβιοτικοί παράγοντες υπό το πρίσμα της επίδρασής τους στην ανάπτυξη και απόδοση των φυτών (Dong et al., 2004; Wu et al., 2007; Chen et al., 2008a,b), όπως η ξηρασία (Dong et al., 2005; Zhang et al., 2007) και η αλατότητα (Ren et al., 2006).

Κατά την επίδραση των βιοτικών καταπονήσεων, επάγεται με διαφορετικό τρόπο η αντίδραση υπερευαίσθησίας, ανάλογα με το είδος της χαρπίνης. Συνήθως, η σηματοδότηση ξεκινά μέσω του σαλικυλικού οξέος και ενεργοποιεί τις χαρπίνες που προκαλούν άμεση κυτταρική νέκρωση και έγχυσή τους στον αποπλάστη των φυτών (Ταμπακάκη, 1999, σελ 55; Dong et al., 1999). Η χαρπίνη HrpZ του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* φαίνεται να επάγει την αντίδραση υπερευαίσθησίας (HR) (He et al., 1993), την επίκτητη διασυστηματική ανοχή (Strobel et al., 1996) και την έκφραση σχετιζόμενων με την άμυνα γονιδίων (Gopalan et al., 1996) όταν εκχέεται στον αποπλάστικο χώρο των φυτών. Επίσης, σε μία άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο βακτήριο *Erwinia amylovora*, βρέθηκε ότι η χαρπίνη HrpN αυξάνει την ανθεκτικότητα έναντι του μύκητα *Peronospora parasitica* και του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000), μειώνοντας τον αριθμό των σχηματιζόμενων κονιδιοσπορίων και αποικιών αντίστοιχα, όταν εφαρμόστηκε σε φυτά αραβίδωσης (Dong et al., 1999). Επιπροσθέτως, από το βακτήριο *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* προέρχεται η χαρπίνη HrpF1, η οποία φαίνεται να παρέχει μη εξειδικευμένη ανθεκτικότητα στο μύκητα *Magnaporthe grisea* (Shao et al., 2008). Τέλος, διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* και τεύτλων, που εκφράζουν το γονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}*, από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, εμφανίζουν υψηλό επίπεδο ανθεκτικότητας στον ιό *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), που προκαλεί την ασθένεια της ριζομανίας των τεύτλων (Pavli et al. 2011).

Εκτός από την ενεργοποίηση της αντίδρασης υπερευαίσθησίας υπό την καταπόνηση βιοτικών παραγόντων, υπάρχουν έρευνες που αποδεικνύουν μια σειρά επιθυμητών

αντιδράσεων των φυτών σε αβιοτικούς παράγοντες. Παράλληλα, οι χαρπίνες επηρεάζουν και την αναπτυξιακή βιολογία των φυτών αυξάνοντας κυρίως το ρυθμό ανάπτυξης, την ευρωστία, την απορρόφηση θρεπτικών στοιχείων και τη φωτοσύνθεση (Kim and Beer, 2000; Oh and Beer, 2007; Pavli et al., 2011) (Εικόνα 1.9). Με στόχο την επίτευξη αύξησης της απόδοσης και ποιότητας της παραγωγής, οι έρευνες έδειξαν ότι γονίδια χαρπίνης ήταν υπεύθυνα για την προώθηση της ανάπτυξης του ριζικού συστήματος και του υπέργειου μέρους των φυτών. Επιπρόσθετα, είναι αξιοσημείωτο ότι έχει βρεθεί πως η ενδογενής έκφραση γονιδίων που κωδικούν χαρπίνες επηρεάζει και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών. Αυτό συμβαίνει είτε μειώνοντας τον αριθμό των κυττάρων του καμβίου, ή μειώνοντας το μέγεθος των επιδερμικών κυττάρων (Jang et al., 2006). Ωστόσο, τα συγκεκριμένα ευρήματα δεν έχουν μελετηθεί εκτεταμένα και από πλειάδα ερευνητών. Παράδειγμα ωστόσο αποτελεί η χαρπίνη HrpNEa, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *hrpNEa* του βακτηρίου *Erwinia amylovora*, η οποία κατά την έκφρασή της σε φυτά *A. thaliana* φαίνεται να επηρεάζει την ανάπτυξή τους και προάγει την ανθεκτικότητα σε έντομα, μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού του αιθυλενίου (ET). Επίσης, ενεργοποιεί το μονοπάτι του αμπισισικού οξέος (ABA), επάγοντας την ανθεκτικότητα φυτών *A. thaliana* υπό συνθήκες ξηρασίας (Dong et al., 2004). Επίσης, η HrpZ_{Psp}, κατά την ενδογενή εφαρμογή της σε φυτά του είδους *N. benthamiana* καθώς και σε διαγονιδιακές ρίζες ζαχαρότευτλου, φάνηκε να συνδέεται με προώθηση της αύξησης και του ρυθμού ανάπτυξης καθώς και αυξημένο επίπεδο ευρωστίας (Pavli et al. 2011).

Η ανάγκη της αγοράς για εναλλακτικές λύσεις προστασίας των φυτών από παθογόνα (Diaz-Perez, 2007) και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης (Βακαλουνάκης & Φραγκιαδάκης, 2003), οδήγησε στην δημιουργία σκευασμάτων χαρπίνης. Τα σκευάσματα αυτά είναι φιλικά στο περιβάλλον καθώς η δράση τους οφείλεται στην επαγωγή των αμυντικών μηχανισμών (Lyon & Newton, 2000). Το πρώτο σκεύασμα περιέχει ως δραστική ουσία τη χαρπίνη HrpNEa που προέρχεται από το βακτήριο *Erwinia amylovora*, και διατίθεται με την εμπορική ονομασία Messenger® /Harp-N-Tek Harpin Protein (Eden Bioscience Corporation). Ένα ακόμη σκεύασμα που βασίζεται στις χαρπίνες είναι το ProAct®, το οποίο συνιστά ένα φυσικό βιοδιεγέρτη της ανάπτυξης των φυτών για ένα μεγάλο εύρος καλλιεργειών. Το ProAct® αποτελείται από τα προϊόντα έκφρασης των γονιδίων *hrpN* του *Erwinia amylovora*, *hrpZ* του *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* και *popA* του *Ralstonia solanacearum* (www.efthymiadis.gr).



Εικόνα 1.9 Σχηματική απεικόνιση του ρόλου των χαρπινών στα φυτά.

(Πηγή: Pavli et al., 2008)

Η εφαρμογή των σκευασμάτων που περιέχουν χαρπίνες γίνεται είτε διαφυλλικά με ψεκασμό είτε με ριζοπότισμα. Κατά την επαφή με το φυτό, προκαλείται ενεργοποίηση ενζύμων για την παραγωγή πρωτεϊνών, οι οποίες στη συνέχεια διεγείρουν τα βιοχημικά μονοπάτια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα φυτά. Παράλληλα, η εφαρμογή των σκευασμάτων προσδίδει μεταβολικό πλεονέκτημα στα φυτά, προάγοντας την ανάπτυξη, μέσω της βελτιωμένης απορρόφησης θρεπτικών στοιχείων, της αυξημένης φωτοσύνθεσης και ευρωστίας. Τέλος, τα φυτά που έχουν δεχθεί εξωγενή εφαρμογή χαρπινών αποδίδουν προϊόντα που παρουσιάζουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής στο ράφι.

1.8. Ο ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά

Προκειμένου να ανταπεξέλθουν στους αναρίθμητους εχθρούς και ασθένειες με τους οποίους έρχονται αντιμέτωπα, τα φυτά έχουν αναπτύξει σύνθετους μηχανισμούς άμυνας (Ballhorn et al., 2009) που συχνά βασίζονται στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (Wink, 1999). Ως διεγέρτες της παραγωγής των δευτερογενών μεταβολιτών αξιοποιούνται οι ρυθμιστές ανάπτυξης των φυτών (Plant Growth Regulators, PGR), που είναι φυσικές ορμόνες και τα συνθετικά ανάλογά τους (Basra, 2000). Η αντίδραση των φυτών στους ρυθμιστές ανάπτυξης μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το είδος, την ηλικία του φυτού, την ποικιλία, τις περιβαλλοντικές συνθήκες, το στάδιο ανάπτυξης καθώς και την ενδογενή ορμονική ισορροπία (Aftab et al., 2010; Idrees et al., 2010a, Idrees et al., 2010b, Idrees et al., 2011, Idrees et al., 2012; Naeem et al., 2009, Naeem et al., 2010, Naeem et al., 2011).

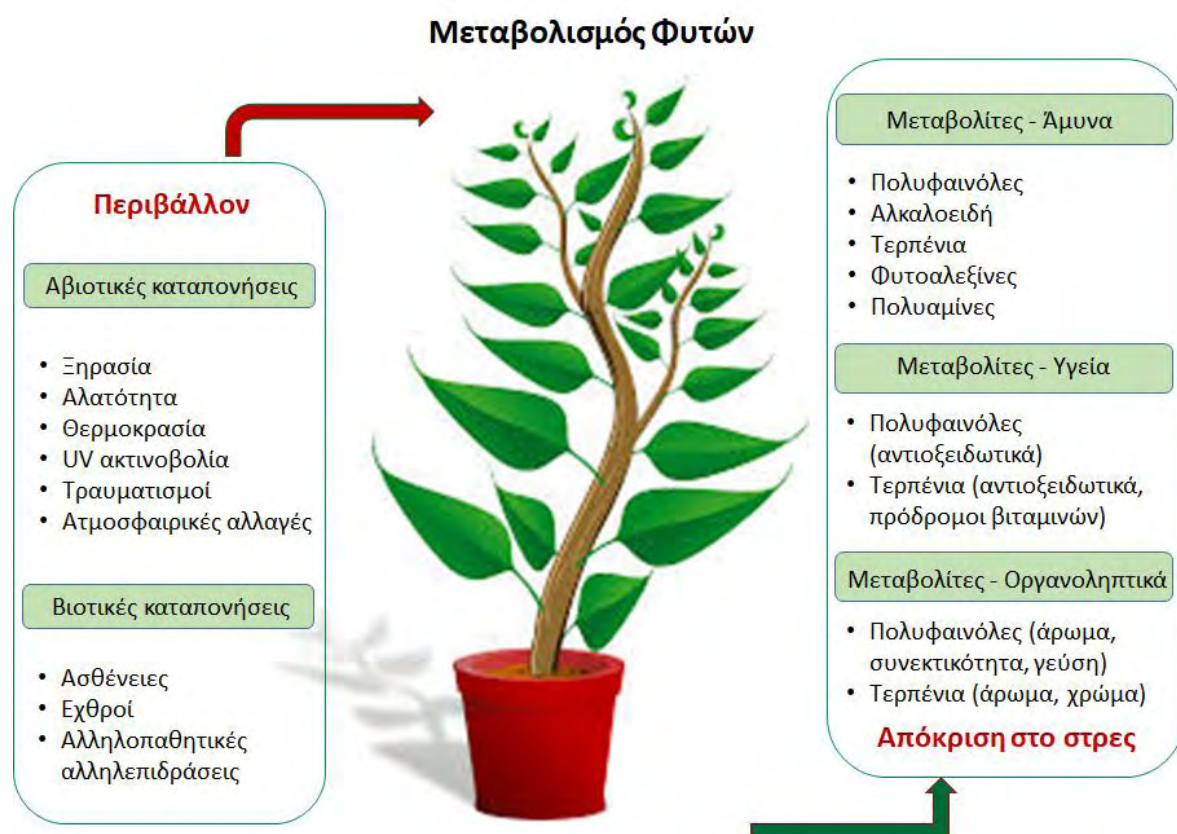
Μία σημαντική κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών είναι τα συστατικά που παρουσιάζουν σημαντική αντιμικροβιακή δράση. Το φυτό *Arabidopsis thaliana*, όπως και πολλά άλλα είδη της οικογένειας Brassicaceae παράγουν αντιμικροβιακά συστατικά, τους θειογλυκοζίτες. Οι ουσίες αυτές αποθηκεύονται ως ανενεργές μορφές και με τη βλάβη κάποιου ιστού, διασπώνται από μία θειογλυκοσιδάση σε επιμέρους προϊόντα, μερικά από τα οποία αναστέλλουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών (Tierens et al., 2001). Εκχυλίσματα από το φυτό *Centaurea raphanina* Sm. ssp. mixta, βρέθηκαν να έχουν μυκητοκτόνο δράση. Τα κύρια συστατικά τους ήταν πολυφαινόλες και μόνο μία σεσκιτερπενική λακτόνη, η κνικίνη. Οι *in vitro* δοκιμές έδειξαν ότι η μυκητοκτόνος δράση οφείλεται στην κνικίνη, η οποία φαίνεται να είναι περισσότερο δραστική και από το μυκητοκτόνο μικοναζόλη (Panagouleas et al., 2003).

Παράδειγμα αντιμικροβιακής δράσης είναι επίσης αυτό των εκχυλισμάτων του φυτού *Thymus fallax*. Μελέτες έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα αυτού του φυτού είναι πλούσια σε μονοτερπένια, φαινόλες και ειδικά σε θυμόλη, καρβακρόλη, c-τερπενίνη και p-κιμίνη. Τα αποτελέσματα μίας μελέτης, των Ozturk και Ercisli (2005), οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το μεθανολικό εκχύλισμα του *Thymus*, είχε αντιβακτηριακή δράση σε 27 από τα 52 είδη βακτηρίων που εξετάστηκαν, μεταξύ των οποίων και το *P. syringae*. Επιπρόσθετα, η πογκαμίνη παρουσιάζει ισχυρή αντιβακτηριακή δράση εναντίον διαφόρων επιβλαβών στελεχών, όπως τα Gram-θετικά αλλά και Gram-αρνητικά βακτήρια, συνίσταται για συμπτώματα όπως η κηλίδωση των φύλλων, ο μαρασμός και τα καρκινώματα (www.ottawaorchidsociety.com/orchid/neem_oil.htm).

Το HCN που παράγεται από φθορίζουσες ψευδομονάδες έχει δείξει τοξικότητα έναντι φυτοπαθογόνων με αναστολή της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (Devi and Kothamasi, 2009). Οι PCA και PYO φαιναζίνες βρέθηκαν να είναι πολύ αποτελεσματικές στη θεραπεία μυκητιακών παθήσεων. Το μεγαλύτερο μέρος του PHZ είναι αποτελεσματικό στην βιολογική παρακολούθηση αρκετών μυκητιακών και βακτηριακών ασθενειών (Chincholkar and Thomashow, 2014). Υπάρχουν αρκετές πειραματικές μελέτες που επιβεβαιώνουν ότι το DAPG αποτελεί μείζον αντιμικροβιακό μεταβολίτη που εμπλέκεται στο βιολογικό έλεγχο των φυτοπαθογόνων (Sonnleitner and Haas, 2011). Είναι ένας τύπος παραγώγου φλορογλουκινόλης που παράγεται από φθορίζουσες ψευδομονάδες (Troppens et al., 2013).

Το σύστημα άμυνας των φυτών χρησιμοποιεί φαινόλες κατά παρασίτων και ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου των παρασιτικών νηματωδών ριζών (Wuyts et al., 2006). Διαθέτουν αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και άλλες σημαντικές βιολογικές ιδιότητες και

μπορούν να προστατεύσουν από το οξειδωτικό στρες και ορισμένες ασθένειες (Park et al., 2001). Οι κουμαρίνες φαινόλες προέρχονται από την οδό σικιμικού οξέος (Murray et al., 1982). Περιείχαν μια πολύ δραστική ομάδα μορίων με ένα εκτεταμένο εύρος αντιμικροβιακής δράσης έναντι των μυκήτων και των βακτηριδίων (Brooker et al., 2008). Ένα από τα σημαντικότερα αμυντικά συστήματα των φυτών κατά της προσβολής από παθογόνα είναι η παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων που ονομάζονται φυτοαλεξίνες (Kodama et al., 1992).



Εικόνα 1.10 Ως απόκριση στις συνθήκες του περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσονται, τα φυτά παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι εμπλέκονται σε επαγόμενους μηχανισμούς άμυνας, στην υγεία και θρέψη καθώς και σε σημαντικά οργανοληπτικά γνωρίσματα.

Εντομοαπωθητική ή εντομοκτόνο δράση, έχουν κυρίως τα αλκαλοειδή αλλά και τα τερπένια, τα φλαβονοειδή, και οι απλές φαινολικές ενώσεις (Wink, 1988). Φαινολικά γλυκοσίδια και τερπένια έχει αναφερθεί ότι απωθούν και θηλαστικά τα οποία είναι θηρευτές της φυτομάζας (Andrew et al., 2007).

Αλληλοπαθητική δράση παρουσιάζουν οι φαινολικές ενώσεις, οι οποίες είναι οι πλέον διαδεδομένες αλληλοπαθητικές ουσίες και ακολουθούν τα τερπένια, τα φλαβονοειδή, τα αλκαλοειδή και τα κυανογενή γλυκοσίδια (Machrafī et al., 2006). Οι φαινολικές ενώσεις μπορεί να προκαλέσουν αναστολή της ανάπτυξης ή της αναπαραγωγής γειτονικών φυτών, όπως για παράδειγμα η έκλυση κατεχίνης από το ζιζάνιο *Centaurea maculosa* (Taiz and Zeiger 2006). Ένα άλλο παράδειγμα αλληλοπαθητικής δράσης είναι αυτό του σιταριού. Το σιτάρι παράγει δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι εμποδίζουν την ανάπτυξη ζιζανίων όπως τα *Digitaria sanguinalis*, *Amaranthus retroflexus* L., *Echinocloa crusgalli* L., *Poa annua* L. και *Avena fatua*. (www.regional.org.au/au/allelopathy/2005/2/1/2475_zhengyq).

Ως σήματα επικοινωνίας, με γειτονικά φυτά του ίδιου ή διαφορετικού είδους, δρουν κάποιοι πτητικοί δευτερογενείς μεταβολίτες, με αποτέλεσμα να προειδοποιούν τα φυτά «δέκτες» των σημάτων για κάποια επικείμενη προσβολή. Έτσι τα φυτά δέκτες ενεργοποιούν τους αμυντικούς μηχανισμούς τους και αντιμετωπίζουν αποτελεσματικότερα την επίθεση που δέχονται από τους εχθρούς ή την προσβολή από μικροοργανισμούς (Dicke et al., 2003, Baldwin et al., 2006, Preston et al., 2001).

Προστατευτική δράση έναντι υψηλών θερμοκρασιών, βρέθηκε ότι έχουν τα τερπένια, των οποίων η μείωση καθιστά το φυτό περισσότερο ευάλωτο σε θερμοκρασιακές καταπονήσεις (Pare and Tumlinson, 1999). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η Phenazines (PHZ) μπορεί να αντιδράσει με τους κύριους μεταβολίτες και να μετασχηματιστεί με ένζυμα που εμπλέκονται σε κεντρικές μεταβολικές οδούς. Αυτά τα χαρακτηριστικά υποδεικνύουν τον πιθανό ρόλο τους στον μεταβολισμό πρωτογενών κυττάρων, βελτιώνοντας έτσι τα χαρακτηριστικά του φυτού κατά την ανάπτυξή του και ιδιαίτερα σε συνθήκες στρες (Price-Whelan et al., 2006). Ο δευτερογενής μεταβολίτης VOCs έχει παρατηρηθεί ότι προάγει την ανάπτυξη των φυτών (Park et al., 2015). Η αύξηση της συγκέντρωσης ισοφλαβονοειδών επάγει την ταχύτερη ανάπτυξη των φυτών στο είδος *Genista tinctoria* (Luczkiewicz et al., 2014).

Αντιοξειδωτική και προστατευτική δράση από την υπεριώδη ακτινοβολία έχουν κυρίως τα φλαβονοειδή καθώς και άλλες ενώσεις της επιδερμίδας των φύλλων, οι οποίες απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία (Xu et al., 2008). Σύμφωνα με την έρευνα των Winkel-Shirley (2001), η εφαρμογή διαφορετικών ρυθμιστών ανάπτυξης επάγει την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών και αύξηση της περιεκτικότητας σε ανθοκυανίνες, η οποία είναι χρήσιμη για την προστασία φυτών από βλάβη από ακτινοβολία UV.

1.9. Μεταβολομική

Η κατανόηση των βιοχημικών μονοπατιών που συνιστούν το σύνολο του μεταβολισμού είναι ένα από τα μεγαλύτερα επιτεύγματα της έρευνας των βιολογικών επιστημών τις τελευταίες δεκαετίες. Η μεταβολομική είναι υψηλής απόδοσης βιομοριακή ανάλυση ή αλλιώς "ομική" ανάλυση που στοχεύει στην αξιολόγηση και κατανόηση της επίδρασης της έκθεσης βιολογικών συστημάτων σε βιοδραστικούς παράγοντες μέσω της μελέτης του μεταβολισμού τους (Aliferis and Jabaji, 2011). Στην μεταβολομική καταγράφονται ταυτόχρονα τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά δεδομένα για έναν μεγάλο αριθμό μεταβολιτών ενός βιολογικού συστήματος, όπως αμινοξέα, λιπίδια, υδατάνθρακες, ορμόνες, αζωτούχες ενώσεις κ.ά. (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011, Fiehn, 2002). Βαρύτητα δίνεται στη μελέτη και ανάλυση των μεταβολιτών χαμηλού μοριακού βάρους που βρίσκονται σε κύτταρα, βιο-υγρά, ιστούς, φυτά, τρόφιμα κ.α., παρέχοντας πληροφορίες με μεγάλη λεπτομέρεια σχετικά με τα βιολογικά συστήματα και την τρέχουσα κατάστασή τους (Weckiverth, 2003). Με την μεταβολομική μπορεί να γίνει ανάλυση ανάλογα με την επίδραση του χρόνου, του παράγοντα καταπόνησης και της θρεπτικής κατάστασης σε εκατοντάδες μεταβολίτες που παράγονται ταυτόχρονα παρέχοντας σύνθετα σύνολα δεδομένων (Dixon et al., 2006). Μεταξύ άλλων, η σημασία της μεταβολομικής ανάλυσης έγκειται στο γεγονός ότι μπορεί να συμβάλει προς τη σύνδεση της λειτουργίας του γονιδιώματος με το φαινοτυπικό αποτύπωμα των οργανισμών (Aliferis and Jabaji, 2011).

Η μεταβολή στη συγκέντρωση των μεταβολιτών αντανακλάται στην φυσιολογία και τον φαινότυπο των οργανισμών που έχουν υποστεί την επίδραση κάποιου βιοδραστικού παράγοντα. Είναι εφικτό να μελετώνται οι αλλαγές, εξαιτίας των βιοτικών και/ή αβιοτικών παραγόντων που τις προκαλούν, στα μεταβολικά δίκτυα και να ανιχνεύονται οι αντίστοιχοι βιοσημαντικοί μεταβολίτες, που αντιστοιχούν σε αυτές τις αλλαγές (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

Η μεταβολομική είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την ολοκληρωμένη μελέτη της φυσιολογίας των οργανισμών, που περιλαμβάνει εκτός από χημικές αναλύσεις και την εξαγωγή δεδομένων, τον πειραματικό σχεδιασμό και την εκτέλεση, την προεπεξεργασία των δεδομένων, αναλύσεις βιοπληροφορικής, και τη βιολογική ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Για την πραγματοποίησή της συνδυάζονται

γνώσεις πολλών επιστημονικών πεδίων, όπως της αναλυτικής χημείας, της επεξεργασίας δεδομένων, της βιολογίας, της βιοπληροφορικής, της στατιστικής, της φυσιολογίας κ.α.

Η επιλογή της κατάλληλης αναλυτικής μεθόδου που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες και τη χημική σύνθεση των δειγμάτων, τον σκοπό της έρευνας, τα διαθέσιμα όργανα και την τεχνογνωσία (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν την αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με τη φασματομετρία μάζας (OC/MB), την υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με τη φασματομετρία μάζας (LC/MS), την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (CE/MS), τη φασματοσκοπία μάζας συντονισμού-μετασχηματισμού ιόντων κατά Furler (FT-ICR/MS) (Oikawa et al., 2006) και τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Η πλειοψηφία των μεταβολομικών μελετών έχει γίνει με την χρήση NMR (Ralston-Nooper et al., 2008) και MS. Το MS πλεονεκτεί ως προς το NMR στο ότι εξοικονομεί ενέργεια, παρέχοντας υψηλότερη ευαισθησία και χαμηλότερο κατώτατο όριο ανίχνευσης (Shulaev et al., 2008). Ωστόσο, το NMR έχει υψηλή επαναληψιμότητα και ελαχιστοποιεί τις απαιτήσεις κατά την προετοιμασία των δειγμάτων. Παρόλα αυτά, το NMR παρουσιάζει δυσκολία αναγνώρισης των μεταβολιτών σε πολύπλοκα δείγματα μέσα από βάσεις δεδομένων (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

Στις γεωπονικές επιστήμες και στις επιστήμες περιβάλλοντος, η μεταβολομική έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση φυτικών ιστών και τη διερεύνηση της φυσιολογίας καταπονήσεων (Kráľová et al., 2012) και (Shulaev et al., 2008), τη δράση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στα φυτά (Aliferis and Jabaji, 2011), τη διερεύνηση της άμυνας του φυτού έναντι παθογόνων, όπως των μυκήτων (Aliferis et al., 2014), καθώς επίσης και για πιο εξειδικευμένες μελέτες, όπως η δράση του όζοντος σε φυτά *Oryza sativa* L. (Cho et al., 2008) και σε *Rhaphanus sativus* L. (Park et al., 2016).

1.10. Η συμβολή της Μοριακής Βελτίωσης

Η κλασσική γενετική βελτίωση έχει να επιδείξει αδιαμφισβήτητα πληθώρα επιτευγμάτων στη δημιουργία σύγχρονων υψηλοαποδοτικών ποικιλιών με βελτιωμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά, σταθερή απόδοση και προσαρμοστικότητα σε ποικίλα

περιβάλλοντα, αποτελεσματικότητα αξιοποίησης εισροών για αύξηση των αποδόσεων καθώς και αναβαθμισμένη ανθεκτικότητα σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. Παρά την επιτευχθείσα πρόοδο, είναι πλέον ορατή η ανάγκη περαιτέρω βελτίωσης των ποικιλιών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι α) η σύγχρονη γεωργία οφείλει να εναρμονιστεί με τα διεθνή πρότυπα αειφορίας, που επιτάσσουν τη μείωση των χρησιμοποιούμενων εισροών, β) η ραγδαία εξελισσόμενη μείωση των διαθέσιμων φυσικών πόρων συγκλίνει επίσης προς την τάση μείωσης των χρησιμοποιούμενων εισροών, γ) η κλιματική αλλαγή ασκεί τεράστια επιλεκτική πίεση στα καλλιεργούμενα είδη ενώ παράλληλα η προοδευτική υποβάθμιση των εδαφών θέτει φραγμούς στην καλλιέργεια μεγάλων εκτάσεων σε παγκόσμιο επίπεδο και δ) οι αλλαγές στην επιδημιολογία αγρού και στη μοριακή επιδημιολογία των παθογόνων, σε συνδυασμό με την εξάντληση των φυσικών πηγών ανθεκτικότητας για το σύνολο σχεδόν των επιζήμιων ασθενειών και εχθρών, επιτάσσουν την εύρεση εναλλακτικών προσεγγίσεων για την επίτευξη ανθεκτικότητας. Τα τελευταία χρόνια, οι εξελίξεις στους επιστημονικούς κλάδους της μοριακής βιολογίας και τη βιοτεχνολογίας, συμπεριλαμβανομένου της γενετικής μηχανικής, έχουν ανοίξει το δρόμο για την περαιτέρω αναβάθμιση των ποικιλιών και την αντιμετώπιση των ανωτέρω προβλημάτων. Προς την κατεύθυνση αυτή, αξιοποιούνται τα σύγχρονα μοριακά και διαγνωστικά εργαλεία της γονιδιωματικής που δύνανται να συμβάλουν καθοριστικά στην αναβάθμιση της αποτελεσματικότητας των βελτιωτικών διαδικασιών. Μεταξύ άλλων, η αξιοποίηση των τεχνολογιών κινείται σε δύο κύριοι άξονες, που αφορούν στην αξιοποίηση των τεχνολογιών γενετικής μηχανικής για τη βελτίωση κυρίως της ανθεκτικότητας αλλά και άλλων σημαντικών γνωρισμάτων και στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών.

Ο βιολογικός ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών έναντι βιοτικών παραγόντων καταπόνησης, έγκειται κυρίως στην επαγωγή της χημικής άμυνας του φυτού. Είναι εφικτό να επιτευχθεί αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών με την παρουσία συγκεκριμένης ποσότητας κάποιου δευτερογενούς μεταβολίτη. Από την άλλη, είναι δυνατή η δημιουργία τοξικού περιβάλλοντος, με τις έρευνες να εστιάζουν στην ελάχιστη συγκέντρωση της ποσότητας του μεταβολίτη που τον καθιστά τοξικό.

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτού και περιβάλλοντος (Dunareva et al., 2006). Η σύνθεσή τους γίνεται μόνο με την επίδραση κάποιου βιοτικού ή αβιοτικού παράγοντα και καταλύεται από τη δραστηριότητα εξειδικευμένων ενζύμων. Συναντώνται δύο κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών, οι ιδιοσυστατοι ή προϋπάρχοντες, οι οποίοι υπάρχουν συνέχεια στο φυτό και εντοπίζονται πάνω

ή κοντά στην επιφάνεια των οργάνων και οι επαγώγιμοι, που συντίθενται υπό την επίδραση ενός επιβλαβή παράγοντα. Οι επαγώγιμοι ενεργοποιούνται μόνο όταν αντιληφθούν εισβολή ή άλλου είδους καταπόνηση. Γι' αυτό τον λόγο, είναι ιδιαίτερος χρήσιμοι στις μελέτες που αφορούν σε αλληλεπιδράσεις φυτών – παθογόνων μικροοργανισμών καθώς και φυτών – αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης.

Η βιοσύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών πραγματοποιείται από ειδικά ένζυμα. Αναλόγως με τον μεταβολίτη η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε ειδικά όργανα, ιστούς ή κύτταρα και σε συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης. Ο έλεγχος των βιοσυνθετικών γονιδίων είναι ο ίδιος τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και στις αντίστοιχες πρωτεΐνες. Η ύπαρξη του γονιδίου παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη δυνατότητα σύνθεσης ενός συγκεκριμένου μεταβολίτη σε συγκεκριμένα κύτταρα ή ιστούς. Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται πληθώρα πρωτεϊνών η σύνθεση των οποίων επάγεται έπειτα από ενεργοποίηση από έναν ή περισσότερους παράγοντες καταπόνησης. Τα υπεύθυνα βιοσυνθετικά γονίδια είτε ρυθμίζονται θετικά από τον παράγοντα καταπόνησης είτε η παρουσία του τελευταίου συνιστά το έναυσμα για την έναρξη σύνθεσης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Παράλληλα, είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες αυτές συντίθενται από κωδικές αλληλουχίες οι οποίες εμφανίζουν μεγάλο βαθμό συντήρησης μεταξύ των διαφόρων καλλιεργούμενων ή μη ειδών. Η υψηλή ομολογία σε επίπεδο γονιδίων, που σχετίζονται με την άμυνα έναντι καταπονήσεων, καθιστά εφικτή την αξιοποίησή τους μέσω των σύγχρονων εργαλείων της βιοπληροφορικής και μοριακής βιολογίας. Προς την κατεύθυνση αυτή, η ύπαρξη συντηρημένων μοτίβων σε γονίδια τα οποία επάγονται σε συνθήκες καταπόνησης δίνει τη δυνατότητα βελτίωσης της ανθεκτικότητας των φυτών με μεθόδους γενετικής μηχανικής (Λαζαρίδη, 2012).

Στο ίδιο πλαίσιο σημαντική είναι επίσης η συμβολή των μοριακών δεικτών, οι οποίοι προσφέρουν τεράστιες δυνατότητες προς τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας και της ακρίβειας των συμβατικών μεθόδων επιλογής (Collard & Mackill, 2008). Η υποβοηθούμενη από δείκτες επιλογή (MAS) στηρίζεται στη χρήση των μοριακών δεικτών που είναι στενά συνδεδεμένοι με χρωμοσωμικές θέσεις-στόχους που ελέγχουν τα γνωρίσματα ενδιαφέροντος, για να υποκαταστήσει ή να υποβοηθήσει τη φαινοτυπική επιλογή. Με τον καθορισμό των αλληλόμορφων που σημαίνουν οι μοριακοί δείκτες, αναγνωρίζονται φυτά που διαθέτουν γονίδια ή θέσεις ποσοτικών χαρακτήρων (QTL) που ελέγχουν γνωρίσματα ενδιαφέροντος, με βάση το γενότυπο αντί το φαινότυπο. Τα πολυγονίδια (QTL) είναι γενετικοί παράγοντες που ευθύνονται για ένα σημαντικό ποσοστό της φαινοτυπικής παραλλακτικότητας ενός ποσοτικού

γνωρίσματος. Η ταυτοποίηση των QTLs με τη χρήση των μοριακών δεικτών ήταν μια σημαντική πρόοδος στον χαρακτηρισμό των ποσοτικών γνωρισμάτων (Paterson et al., 1988).

1.11. Το είδος *Nicotiana benthamiana*

Το φυτό αυτό ονομάστηκε προς τιμήν του βοτανολόγου George Bentham, ο οποίος το περιέγραψε στο βιβλίο του *Flora Australiensis* το 1868. Το *Nicotiana benthamiana* είναι ένα άγριο είδος καπνού το οποίο είναι ιθαγενές της Αυστραλίας. Ωστόσο, έχει αναπτυχθεί σε διάφορα περιβάλλοντα κι έχουν διαμορφωθεί πολλά είδη του ίδιου γένους. Η παραλλακτικότητα παρουσιάζεται σε επίπεδο μορφολογίας, φυσιολογίας αλλά και σε επίπεδο γονιδιώματος. Πρόκειται για είδος που κατέχει 19 ζεύγη χρωμοσωμάτων και παρουσιάζει μέγεθος γονιδιώματος ~ 3,136 Mbp.

Τα τελευταία χρόνια, το είδος *Nicotiana benthamiana* έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών ως φυτό-μοντέλο καθώς παρουσιάζει ορισμένα χαρακτηριστικά που το καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμο σε έρευνες των γεωπονικών επιστημών. Ένα βασικό πλεονέκτημα του εν λόγω είδους είναι ο μικρός βιολογικός κύκλος, με αποτέλεσμα να καθίσταται εφικτή η σημαντική επιτάχυνση της ερευνητικής διαδικασίας.

Επιπρόσθετα, το είδος χαρακτηρίζεται από ικανοποιητική συχνότητα γενετικού μετασχηματισμού και αναγέννησης ολόκληρων φυτών. Στη διεθνή βιβλιογραφία παρέχεται πλήθος αξιόπιστων και αποτελεσματικών πρωτόκολλων για τον ευχερή μετασχηματισμό και αναγέννηση του είδους, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών και αξιοποίησής τους σε μελέτες λειτουργικής ανάλυσης γονιδίων αλλά και σε μελέτες που αφορούν σε αλληλεπίδραση φυτών-παθογόνων μικροοργανισμών ή άλλων παραγόντων καταπόνησης. Τα γονίδια αυτά είτε είναι υπεύθυνα για την τροποποίηση ενός και μόνο μεταβολίτη, είτε επαγόμενων, από τις καταπονήσεις πρωτεϊνών (μεταφορείς νερού), πρωτεϊνών υπεύθυνων για την παραγωγή ενζύμων, πρωτεϊνών μεταφοράς κ.α. (Chapman et al. 1992; Cruz et al. 1996; Escobar et al. 2003; Lucas 2006). Ενδεικτικά αναφέρεται η ύπαρξη πρωτοκόλλων γενετικού μετασχηματισμού με τη χρήση του ευρέως χρησιμοποιούμενου βακτηριακού φορέα *Agrobacterium tumefaciens* (Horsch et al., 1985a; b) αλλά και ιικών φορέων, όπως ο *Potato virus X* (PVX) (Du et al., 2014). Επιπλέον, το είδος τροποποιείται γενετικά με τη χρήση μεθόδων άμεσου μετασχηματισμού που περιλαμβάνουν την εφαρμογή

πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG) (Gharti-Chhetri et al., 2006), την ηλεκτροπόρωση (Wu and Feng, 1999) και τη βιολιστική μέθοδο (Ueki et al., 2013).

Σημαντικό πρόσθετο πλεονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι, λόγω της απομονωμένης εξέλιξης του, προσβάλλεται από ένα ευρύ φάσμα φυτοπαθογόνων ιών και άλλων παθογόνων, που δεν έχουν ως ξενιστή τους το ευρύτατα χρησιμοποιούμενο φυτό – μοντέλο *Arabidopsis thaliana*. Η δυνατότητα εφαρμογής τεχνητών μολύνσεων παρέχει τη δυνατότητα διεξαγωγής ερευνών που αφορούν σε σχέσεις αλληλεπίδρασης φυτών-παθογόνων (Li et al., 2012).

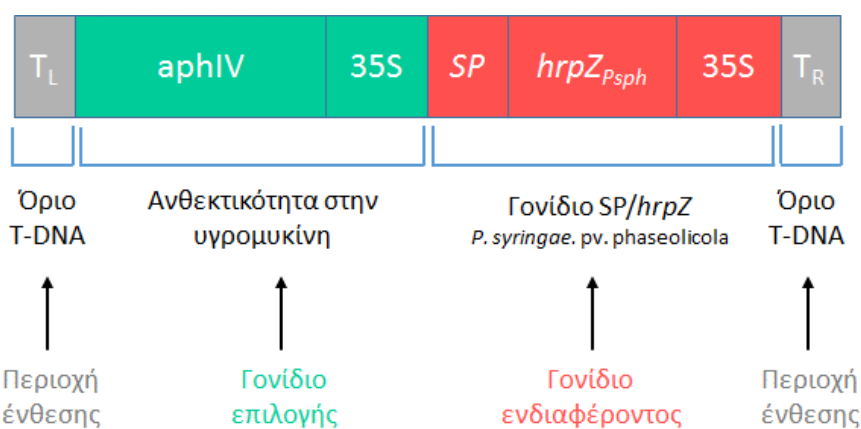
Τέλος, μία σημαντικότερη εφαρμογή του *N. benthamiana* είναι η αξιοποίησή του σε λειτουργικές αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης μέσω της παροδικής έκφρασης διαγονιδίων στους ιστούς του φυτού. Η μέθοδος αυτή αφορά σε αγροεμποτισμό («agrofiltration») των ιστών, συνηθέστερα φύλλων, με κύτταρα βακτηριακής ή ιικής προέλευσης, που εκφράζουν τα υπό μελέτη γονίδια, και λειτουργούν ως φορείς. Ο αγροεμποτισμός βρίσκει εφαρμογή στην ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών, δευτερογενών μεταβολιτών και άλλων ουσιών με αυξημένη προστιθέμενη αξία, στη μελέτη της λειτουργίας γονιδίων καθώς και ρυθμιστικών στοιχείων που εκφράζουν τα υπό μελέτη γονίδια (Goodin et al., 2008).

Με δεδομένο ότι έχει αποδειχθεί ευρέως η ιδιότητα των χαρπινών, κατά την ενδογενή έκφραση ή την εξωγενή εφαρμογή τους, να επάγουν τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών, στόχο της μεταπτυχιακής διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση της επίδρασης της χαρπίνης HrpZ_{Psph}, σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana*. Στη μελέτη αξιοποιήθηκαν διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν τη χαρπίνη HrpZ_{Psph}, από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, στην εκκρινόμενη μορφή της (SP/HrpZ_{Psph}) ώστε η έκφραση της πρωτεΐνης να κατευθύνεται στον αποπλάστη των φυτών. Κύριο στόχο αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης του διαγονιδίου SP/hrpZ_{Psph} ως προς i) την ανθεκτικότητα έναντι ασθενειών και ii) το μεταβολισμό των φυτών. Για το σκοπό αυτό, αρχικά έγινε αξιολόγηση των διαγονιδιακών σειρών προκειμένου να επιλεγούν ομοζύγωτες για το διαγονίδιο SP/hrpZ_{Psph} σειρές που θα αποτελέσουν το φυτικό υλικό για τα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας και της μεταβολομικής. Ακολούθησε συγκριτική αξιολόγηση της ανθεκτικότητας των επιλεγμένων ομοζύγων σειρών με φυτά αγρίου τύπου έναντι της ασθένειας της βακτηριακής κηλίδωσης, που προκαλείται από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. tomato (DC3000), σε μακροσκοπικό επίπεδο καθώς και με τη μελέτη της αποίκησης του βακτηρίου. Στο πλαίσιο της μεταβολομικής, έγινε εκχύλιση των μεταβολιτών και ακολούθησε ανάλυση σε πλατφόρμα αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με ανιχνευτή μάζας. Τέλος, έγινε επεξεργασία των μεταβολικών προφίλ προκειμένου να προσδιοριστούν οι τάσεις στα δεδομένα καθώς και οι σημαντικοί βιοδείκτες.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Φυτικό υλικό

Φυτικό υλικό της παρούσας διατριβής αποτέλεσαν διαγονιδιακές σειρές του είδους *Nicotiana benthamiana* που εκφράζουν το γονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}* (Pavli et al., 2011; 2012). Οι σειρές προέκυψαν από γενετικό μετασχηματισμό φυτών με βακτηριακά κύτταρα του *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (Pavli et al., 2011), τα οποία είχαν προηγουμένως μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο pBin.Hyg.Tx-SP/hrpZ_{P_{sph} (Tampakaki and Panopoulos, 2000). Το γονίδιο *hrpZ* προέρχεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 (μεγέθους 995 bp) και εκφράστηκε ως προϊόν σύντηξης με το πεπτίδιο έκκρισης της πρωτεΐνης παθογένειας PR1 του καπνού, ώστε να κατευθύνεται η έκκριση της πρωτεΐνης (SP/HrpZ_{P_{sph}) στον αποπλάστη των φυτών (Εικόνα 2.1) (Tampakaki and Panopoulos, 2000; Pavli et al., 2011). Στην παρούσα μελέτη αξιοποιήθηκαν φυτά T3 γενιάς. Στην Εικόνα 2.1 απεικονίζεται η γονιδιακή κατασκευή που χρησιμοποιήθηκε για το γενετικό μετασχηματισμό φυτών.}}



Εικόνα 2.1 Σχηματική απεικόνιση της γονιδιακής κασέτας που χρησιμοποιήθηκε για το γενετικό μετασχηματισμό φυτών του είδους *N. benthamiana*. Η υπό μεταφορά περιοχή περιείχε το γονίδιο *hrpZ*, από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 (μεγέθους 995 bp), ως προϊόν σύντηξης με το πεπτίδιο έκκρισης PR1 καθώς και το γονίδιο *aphIV* (hygromycin B phosphotransferase) που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό υγρομυκίνη.

(Πηγή: ΜΔΕ Ν. Μητσοπούλου, 2016. ΠΘ)

2.2. Αξιολόγηση – Επιλογή κατάλληλων διαγονιδιακών σειρών

2.2.1 Έλεγχος ομοζυγωτίας

Αρχικό στόχο αποτέλεσε η επιλογή κατάλληλων διαγονιδιακών σειρών που θα αποτελέσουν το φυτικό υλικό για τα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας και της μεταβολομικής. Στο πλαίσιο αυτό, πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της διαγονιδιακής φύσης των σειρών, που εκφράζουν το διαγονίδιο *SP/hrpZP_{sph}* (Pavli et al., 2011; 2012), και η εξέταση της ομοζύγωσης/ετεροζύγωσης κατάσταση του διαγονιδίου *SP/hrpZP_{sph}*. Το γενετικό υλικό που αξιολογήθηκε αφορά σε σπόρους T2 γενιάς.

Η αξιολόγηση των διαθέσιμων σειρών (T2 γενιά) πραγματοποιήθηκε μέσω βλάστησης των σπόρων σε θρεπτικό μέσο επιλογής που περιείχε το αντιβιοτικό υδρομυκίνη (30 mg/l). Αρχικά έγινε επιφανειακή απολύμανση των σπόρων μέσω εμβάπτισης των σπόρων σε διάλυμα χλωρίνης 15 % για 5 min, υπό συνεχή ανάδευση, και ακολούθησε έκπλυση (3x) με αποστειρωμένο dH₂O.

Ακολούθησε η τοποθέτηση των σπόρων σε τριβλία petri που περιείχαν θρεπτικό μέσο επιλογής MS (MS με βιταμίνες, NAA 0,1mg/l, BAP 1mg/l, 3% ζαχαρόζη και 5 gr/l agar, υδρομυκίνη (30 mg/l)). Σε όλες τις διαδικασίες βλάστησης των σπόρων σε θρεπτικό μέσο επιλογής συμπεριλήφθηκαν και σπόροι αγρίου τύπου (wild type, wt), ώστε να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της χρησιμοποιούμενης πίεσης επιλογής. Τα τριβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (23-25 °C, φωτοπερίοδος 16:8 ώρες Φ:Σ) για διάστημα 2-3 εβδομάδων. Στο διάστημα αυτό, καταγράφηκε το ποσοστό βλάστησης των σπόρων παρουσία υδρομυκίνης. Η επιλογή των διαγονιδιακών σειρών πραγματοποιήθηκε βάσει της ύπαρξης διάσπασης ως προς το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό επιλογής (hygromycin B phosphotransferase).

Οι σπόροι των επιλεγμένων ομοζύγων σειρών τοποθετήθηκαν σε ατομικά γλαστράκια τύρφης (jiffy pots) (Εικόνα 2.2). Μετά τη βλάστηση, τα νεαρά σπορόφυτα τοποθετήθηκαν σε γλάστρες που περιείχαν μίγμα χώματος με τύρφη (3:1) και αναπτύχθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (23-25 °C, φωτοπερίοδος 16:8 ώρες Φ:Σ). Κάθε γλάστρα περιείχε ένα φυτό. Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες φυτά αγρίου τύπου.



Εικόνα 2.2 Βλάστηση σπόρων επιλεγμένων ομοζύγων σειρών σε ατομικά γλαστράκια τύρφης (jiffy pots), ανάπτυξη νεαρών σποροφύτων και μεταφορά σε γλάστρες για ατομική ανάπτυξη.

2.2.2 Έλεγχος για την ένθεση του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{Psph}*

Προκειμένου να διαπιστωθεί η ένθεση του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{Psph}* στις επιλεγμένες για ομοζυγωτία σειρές (ενότητα 2.2.1), πραγματοποιήθηκε απομόνωση γονιδιωματικού DNA και ενίσχυση του διαγονιδίου, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμέρασης (polymerase chain reaction, PCR).

Η απομόνωση DNA έγινε με τη χρήση του κιτ NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel GmbH & Co), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά, έγινε ομογενοποίηση του φυτικού ιστού με υγρό άζωτο, και 100mg ιστού τοποθετήθηκαν σε eppendorf. Ακολούθησε προσθήκη 400μl διαλύματος λύσης των κυττάρων (PL1), ανακίνηση και προσθήκη 10μl RNAase A. Τα δείγματα επώαστηκαν στο υδατόλουτρο (65 °C) για 10 min και έπειτα, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο eppendorf με στήλη NucleoSpin® Plant II. Έπειτα από φυγοκέντρηση (11000 rpm) για 2 min, έγινε προσθήκη 450μl buffer PC μεταφορά του δείγματος σε νέο eppendorf με στήλη NucleoSpin® Plant II, όπου προσδένεται το DNA. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (11000 rpm) για 1 min, προσθήκη 400μl διαλύματος έκπλυσης (PW1), εκ νέου φυγοκέντρηση (11000 rpm) για 1 min και απομάκρυνση του υποκείμενου διαλύματος. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη 700μl διαλύματος έκπλυσης (PW2), φυγοκέντρηση (11000 rpm) για 1 min και απομάκρυνση του υποκείμενου. Η διαδικασία έκπλυσης επαναλήφθηκε μία φορά με 200μl διαλύματος PW2, φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υποκείμενου. Τέλος, η στήλη τοποθετήθηκε σε νέο eppendorf, ακολούθησε η προσθήκη 50μl διαλύματος έκλουσης (PE), και έπειτα από επώαση των δειγμάτων στο

υδατόλουτρο στους (65 °C) για 5 min, έγινε φυγοκέντρωση (11000 rpm) για 1 min. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους -20 °C.

Ο έλεγχος για την ένθεση του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{Psph}* έγινε μέσω αντίδρασης PCR, με τη χρήση εξειδικευμένων για το διαγονίδιο εκκινητών:

- *hrpZ_{Psph}* - F: CGAAAGCCCGCATATGGCGCTCGTTCTG
- *hrpZ_{Psph}* - R: CCGTCAGCGGGATCCAGTCAGGCAGCAG

Το μίγμα της PCR περιείχε 2μl DNA ως μήτρα, 0.25μM από κάθε εκκινητή, 200μM dNTPs, 1.25mM MgCl₂, 1x *Taq* buffer, 1.25u *Taq* polymerase (GoTaq Flexi DNA polymerase, Promega) σε τελικό όγκο 20μl. Το πρόγραμμα ενίσχυσης περιελάμβανε ένα αρχικό κύκλο στους 94 °C για 3 λεπτά και στη συνέχεια 30 κύκλους των 30 δευτερολέπτων στους 94 °C, 1 λεπτού στους 50 °C, 1 λεπτού στους 72 °C και ένα τελικό κύκλο επιμήκυνσης στους 72 °C για 5 λεπτά. Τα προϊόντα ενίσχυσης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% με ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1X) με βρωμιούχο αιθίδιο.

2.3. Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας των διαγονιδιακών φυτών έναντι του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Προκειμένου να αξιολογηθεί η ανθεκτικότητα των διαγονιδιακών φυτών έναντι της ασθένειας της βακτηριακής κηλίδωσης του καπνού, τα φυτά υποβλήθηκαν σε τεχνητή μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000) και ακολούθησε η μελέτη της απόκρισής τους σε σύγκριση με φυτά αγρίου τύπου. Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έγινε σε μακροσκοπικό επίπεδο και με μεθόδους ποσοτικοποίησης του παθογόνου.

Για τις τεχνητές μολύνσεις, αξιοποιήθηκαν φυτά ηλικίας περίπου 6 εβδομάδων. Στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας συμμετείχαν 5 φυτά από 5 διαφορετικές σειρές, ενώ συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες και φυτά αγρίου τύπου (5) που μολύνθηκαν με το βακτήριο. Συνολικά αξιολογήθηκαν 30, εκ των οποίων 25 διαγονιδιακά φυτά και 5 φυτά αγρίου τύπου.

Για τη δημιουργία του αιωρήματος βακτηριακών κυττάρων, αρχικά αναπτύχθηκε καλλιέργεια του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000) σε 15ml θρεπτικού μέσου LB

που περιείχε ριφαμπυκίνη (100mg/l) και καναμυκίνη (50mg/l) για 2 ημέρες, στους 28 °C υπό ανάδευση. Όταν η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας έφτασε το OD600 = 0.6, έγινε φυγοκέντρωση (2.500 rpm) για 10 min και επαναδιάλυση των κυττάρων σε dH₂O ώστε να δημιουργηθεί αιώρημα βακτηρίων συγκέντρωσης 10⁸ βακτήρια /ml. Στο αιώρημα προστέθηκε Tween-20 σε συγκέντρωση 0.5% και έπειτα, πραγματοποιήθηκε ψεκασμός των φυτών με το αιώρημα βακτηρίων. Ακολούθησε κάλυψη των φυτών με πλαστική σακούλα για διάστημα 4 ημερών προκειμένου να διατηρηθεί η υγρασία σε υψηλά επίπεδα.

Για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας, λαμβάνονταν παρατηρήσεις σε φαινοτυπικό επίπεδο για διάστημα 10 ημερών. Προκειμένου να αξιολογηθεί περαιτέρω η απόκριση των διαγονιδιακών φυτών, συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου, διενεργήθηκαν συγκριτικές μετρήσεις της αποίκησης του βακτηρίου στα μολυσμένα φύλλα στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση. Για το σκοπό αυτό, 3 φυλλικοί δίσκοι διαμέτρου 1cm από 1 φύλλο για το κάθε φυτό, τοποθετήθηκαν σε 1,5 ml tubes που περιείχε 1ml αποστειρωμένο mQ νερό και λειοτριβήθηκαν με τη βοήθεια ειδικού εμβόλου. Τα ομογενοποιημένα εκχυλίσματα Pst DC3000-μολυσμένων φύλλων χρησιμοποιήθηκαν για επίστρωση σε τρυβλία petri που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα LB με ριφαμπυκίνη 50mg/l. Για κάθε δείγμα εκχυλίσματος, η επίστρωση έγινε 3 φορές με 10 μl από 3 αραιώσεις 1/10, 1/100, 1/200. Μετά από επώαση 2 ημερών στους 28 °C, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις των αποικιών που αναπτύχθηκαν στο κάθε τρυβλίο και έγινε συγκριτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, λαμβάνοντας υπόψη και το φαινότυπο που παρουσίασαν τα μολυσμένα φυτά.

2.4. Μεταβολομική ανάλυση των διαγονιδιακών σειρών

Οι αναλύσεις της μεταβολομικής, που έγιναν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του ΓΠΑ, υπό την επίβλεψη του Κ. Αλιφέρη (Λέκτορα ΓΠΑ).

2.4.1 Βιολογικό υλικό - Δειγματοληψία

Το βιολογικό υλικό που αξιοποιήθηκε στα πειράματα της μεταβολομικής αφορά σε διαγονιδιακές σειρές του είδους *N. benthamiana* στις οποίες είχε προηγουμένως επιβεβαιωθεί

η ομοζύγωτη κατάσταση (ενότητα 2.2.1) καθώς και η ένθεση του διαγονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* (ενότητα 2.2.2). Οι σπόροι των επιλεγμένων ομοζύγων σειρών τοποθετήθηκαν σε μίγμα χώματος με τύρφη (3:1) και αναπτύχθηκαν θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (23-25 °C, φωτοπερίοδος 16:8 ώρες Φ:Σ). Ακολούθησε μεταφύτευση των σπορόφυτων ώστε κάθε γλάστρα να περιέχει ένα φυτό. Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες φυτά αγρίου τύπου (wt). Στον Πίνακα 2.1 παρατίθενται οι σειρές που αναλύθηκαν στο πλαίσιο της μεταβολομικής.

Πίνακας 2.1 Διαγονιδιακές σειρές και φυτά αγρίου τύπου του είδους *N. benthamiana* που αξιοποιήθηκαν στα πειράματα της μεταβολομικής.

Σειρά	Τύπος διαγονιδίου	Αριθμός δειγμάτων
160-12	<i>SP/hrpZ_{P_{sph}}</i>	4
161-11	<i>SP/hrpZ_{P_{sph}}</i>	4
161-16	<i>SP/hrpZ_{P_{sph}}</i>	4
161-17	<i>SP/hrpZ_{P_{sph}}</i>	5
161-18	<i>SP/hrpZ_{P_{sph}}</i>	4
161-80	<i>SP/hrpZ_{P_{sph}}</i>	5
166-19	<i>SP/hrpZ_{P_{sph}}</i>	4
167-7	<i>SP/hrpZ_{P_{sph}}</i>	4
167-8	<i>SP/hrpZ_{P_{sph}}</i>	5
167-10	<i>SP/hrpZ_{P_{sph}}</i>	4
169-7	<i>SP/hrpZ_{P_{sph}}</i>	4
169-10	<i>SP/hrpZ_{P_{sph}}</i>	4
wt	---	5
Σύνολο: 56 δείγματα		

Η συγκομιδή του φυτικού ιστού έγινε κατά το στάδιο των 6-8 πραγματικών φύλλων και αφορούσε σε 2 μεσαία φύλλα ανά φυτό (Εικόνα 2.3). Κατά τη συγκομιδή, τα φύλλα τοποθετούνταν σε υγρό άζωτο, προκειμένου να εξασφαλιστεί η άμεση διακοπή του μεταβολισμού τους, και έπειτα διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -80 °C. Οι διαφορετικές επεμβάσεις (τύπος σειράς) αποτελούνταν από 4-5 επαναλήψεις ατομικών φυτών.



Εικόνα 2.3 Στάδιο φυτών κατά τη δειγματοληψία. Η συγκομιδή του φυτικού ιστού αφορούσε σε 2 μεσαία φύλλα ανά φυτό.

2.4.2 Εκχύλιση μεταβολιτών – Χημικές αναλύσεις

Για την εκχύλιση των μεταβολιτών, αρχικά πραγματοποιήθηκε κονιορτοποίηση του φυτικού ιστού σε πορσελάνινο γουδί με γουδοχέρι με υγρό άζωτο και τοποθέτηση 40 mg κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού σε eppendorf χωρητικότητας 1.5 ml. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με τη προσθήκη 0,5 ml μίγματος οξικού αιθυλεστέρα – μεθανόλης (50:50, v/v). Ως εσωτερικό πρότυπο στα εκχυλίσματα αξιοποιήθηκε διάλυμα ριβιτόλης σε μεθανόλη (20 mg/ml). Για την εκχύλιση, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων και έπειτα από επώαση για 20 min, μεταφέρθηκαν σε οριζόντιο περιστροφικό αναδευτήρα (150 rpm) για διάστημα 2 ωρών. Ακολούθησε φιλτράρισμα των εκχυλισμάτων, με χρήση σύριγγας και προσαρμοσμένου φίλτρου (0.2 μ m) και εξάτμιση με χρήση συμπυκνωτή.

Για την παραγωγοποίηση των δειγμάτων αρχικά έγινε προσθήκη 80 μ l υδροχλωρικής μεθοξυλαμίνης (MeOX) και επώαση σε υδατόλουτρο, στους 30 °C για 120 min. Ακολούθησε προσθήκη 80 μ l MSTFA και επώαση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο, στους 37 °C για 90 min.

Η ανάλυση των μεταβολιτών έγινε σε πλατφόρμα Agilent 7890A GC (Agilent Technologies Inc.) συζευγμένης με ανιχνευτή μάζας 5973 (inert mass selective detector,

MSD) και αυτόματο δειγματολήπτη 7683 (autosampler) (Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του ΓΠΑ).

2.4.3 Επεξεργασία των δεδομένων

Για την επεξεργασία των δεδομένων της μεταβολομικής χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό MS DIAL και ακολούθησε πολυπαραγοντική ανάλυση των μεταβολικών προφίλ προκειμένου να ελεγχθούν οι τάσεις στα δεδομένα και να προσδιοριστούν οι αντίστοιχοι σημαντικοί βιοδείκτες (biomarkers). Η πολυπαραγοντική ανάλυση έγινε με τη χρήση του λογισμικού SIMCA-P v.12.0 (Umetrics, MKS Instruments Inc. Andover, MA, USA). Ο προσδιορισμός των βιοδεικτών έγινε με τη χρήση της ανάλυσης ορθογώνιων μερικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS-DA) ($P < 0.05$). Η κατηγοριοποίηση των μεταβολιτών στις αντίστοιχες μεταβολικές οδούς έγινε με βάση την κωδικοποίηση που χρησιμοποιείται από τη βάση δεδομένων KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

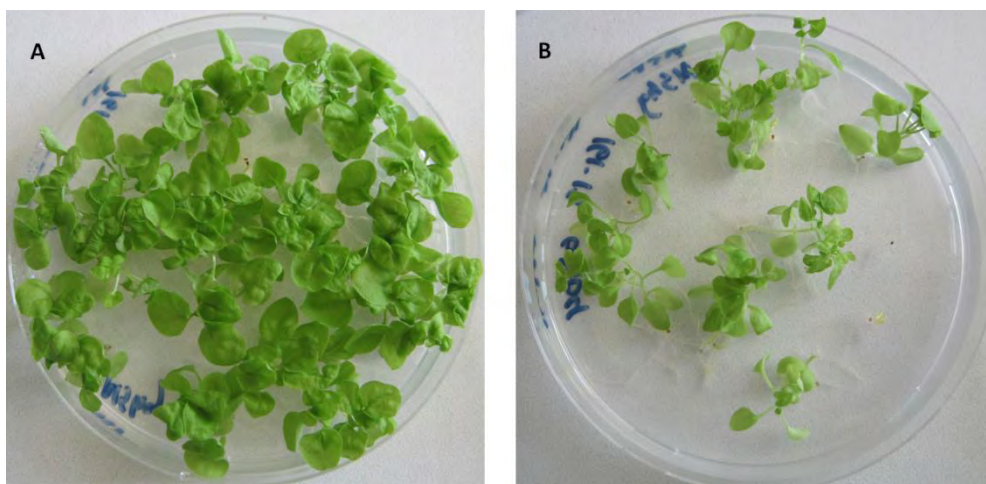
3. Αποτελέσματα

3.1. Αξιολόγηση διαγονιδιακών σειρών

3.1.1 Επιλογή ομοζύγωτων για το διαγονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}* σειρών

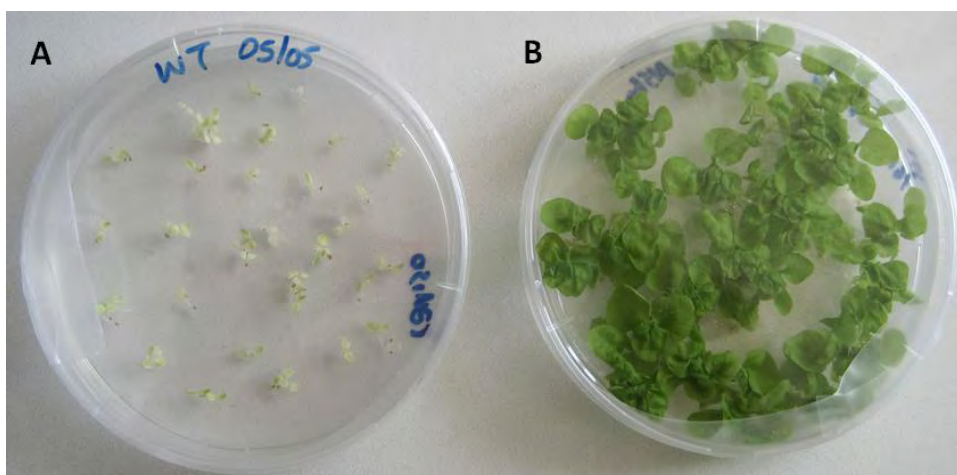
Ο έλεγχος της ομοζύγωσης/ετεροζύγωσης κατάστασης του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{P_{sph}}* πραγματοποιήθηκε μέσω βλάστησης των σπόρων σε θρεπτικό μέσο που περιείχε κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής και προσδιορισμού της αναλογίας διάσπασης ως προς το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό υγρομυκίνη (hygromycin B phosphotransferase). Πιο συγκεκριμένα, έγινε καταμέτρηση των ανθεκτικών στην υγρομυκίνη φυταρίων και επιλέχθηκαν οι σειρές που εμφάνισαν βλάστηση σε ποσοστό 100 % και απουσία διάσπασης ως προς το γνώρισμα αυτό (Εικόνα 3.1).

Στο πλαίσιο αυτό, αξιολογήθηκαν συνολικά 21 γενετικά μετασχηματισμένες σειρές και προσδιορίστηκαν 12 σειρές που παρουσίασαν ομοζυγωτία για το διαγονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}*. Οι σειρές που χαρακτηρίστηκαν ως ετεροζύγωτες παρουσίασαν αναλογία διάσπασης 3:1, γεγονός που συνάδει με τη Μενδελιανή κληρονομικότητα μονογονιδιακών γνωρισμάτων.



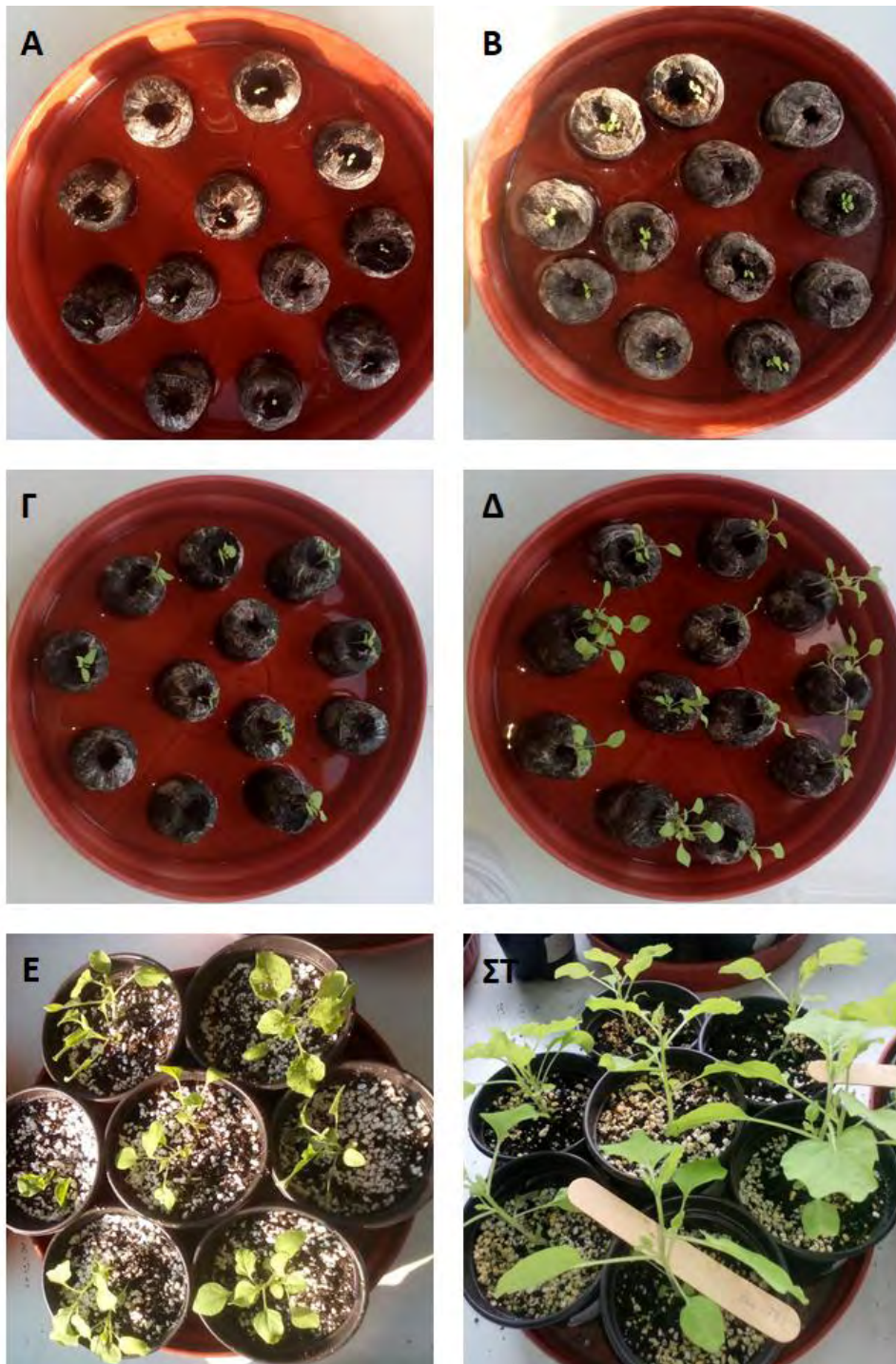
Εικόνα. 3.1 Επιλογή σπόρων μετασχηματισμένων σειρών του είδους *Nicotiana benthamiana* (T₂ γενιά) σε θρεπτικό μέσο επιλογής που περιέχει υγρομυκίνη (30 mg/l). **A** Ομοζύγωτη για το διαγονίδιο σειρά (ποσοστό βλάστησης = 100 %). **B** Ετεροζύγωτη σειρά (ποσοστό βλάστησης < 100 %). Η ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη επιβεβαιώνει τη διαγονιδιακή φύση των T₂ σειρών.

Η αποτελεσματικότητα της χρησιμοποιούμενης πίεσης επιλογής επιβεβαιώθηκε μέσω βλάστησης σπόρων αγρίου τύπου (wt) σε θρεπτικό μέσο που περιείχε αντιβιοτικό επιλογής (Εικόνα 3.2).



Εικόνα. 3.2 Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της χρησιμοποιούμενης πίεσης επιλογής, μέσω βλάστησης σπόρων αγρίου τύπου (wt) του είδους *Nicotiana benthamiana* παρουσία και απουσία του αντιβιοτικού επιλογής υδρομυκίνη (30 mg/l). **A** Αδυναμία βλάστησης και ανάπτυξης των φυτών αγρίου τύπου υπό συνθήκες πίεσης επιλογής. **B** Απρόσκοπτη βλάστηση και ανάπτυξη των φυτών αγρίου τύπου (ποσοστό βλάστησης = 100 %) υπό συνθήκες απουσίας πίεσης επιλογής.

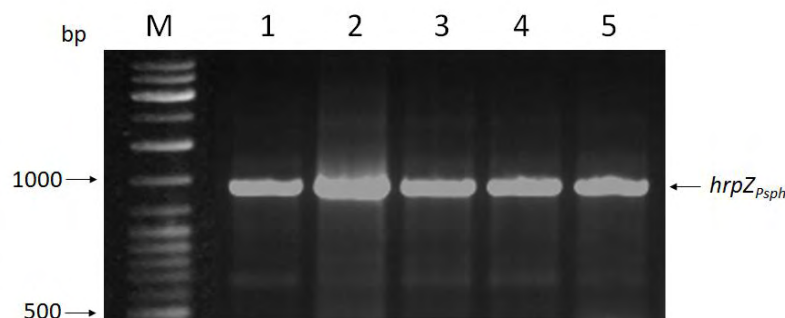
Οι σπόροι των επιλεγμένων - ομοζύγων σειρών τοποθετήθηκαν αρχικά σε ατομικά γλαστράκια τύρφης (jiffy pots) και έπειτα, τα νεαρά σπορόφυτα τοποθετήθηκαν σε γλάστρες όπου αναπτύχθηκαν ατομικά προκειμένου να αξιοποιηθούν για τα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας και της μεταβολομικής. Παρά το γεγονός ότι τα διαγονιδιακά φυτά παρουσίασαν φυσιολογικό φαινότυπο και απουσία νεκρωτικών ή άλλου τύπου συμπτωμάτων, είναι αξιοσημείωτο ότι ορισμένες σειρές εμφάνισαν σαφώς αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης και ευρωστία συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου. Η παρατηρηθείσα προώθηση της ανάπτυξης και υπεροχή έναντι των φυτών αγρίου τύπου αφορούσε σε όλα τα στάδια ανάπτυξής τους (Εικόνα 3.3).



Εικόνα. 3.3 Συγκριτική αξιολόγηση της ανάπτυξης σε φυτά της διαγονιδιακής σειράς 169-10, που εκφράζει τη χαρπίνη SP/HrpZ_{Psph}, και φυτά αγρίου τύπου (wt) του είδους *N. benthamiana*. **Α, Γ, Ε** Φυτά αγρίου τύπου σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. **Β, Δ, ΣΤ** Φυτά της διαγονιδιακής σειράς 169-10, ίδιας ηλικίας.

3.1.2 Επιβεβαίωση της παρουσίας του διαγονιδίου *hrpZ_{PspH}*

Οι επιλεγμένες διαγονιδιακές σειρές εξετάστηκαν, μέσω αντίδρασης PCR, για την παρουσία του διαγονιδίου *hrpZ_{PspH}*. Η επιτυχής ένθεση του διαγονιδίου επιβεβαιώθηκε σε όλα τα φυτά που εξετάστηκαν, με την ενίσχυση προϊόντων αναμενόμενου μεγέθους (995 bp) (Εικόνα 3.4).



Εικόνα. 3.4 Προϊόντα ενίσχυσης PCR σε μετασχηματισμένα φυτά του είδους *N. benthamiana*. M: Marker (Gene Ruler Ladder mix, Fermentas). 1, 2, 3, 4, 5: Μετασχηματισμένα φυτά (T_2 γενιά) που φέρουν το διαγονίδιο *SP/hrpZ_{PspH}*, μεγέθους 995 bp.

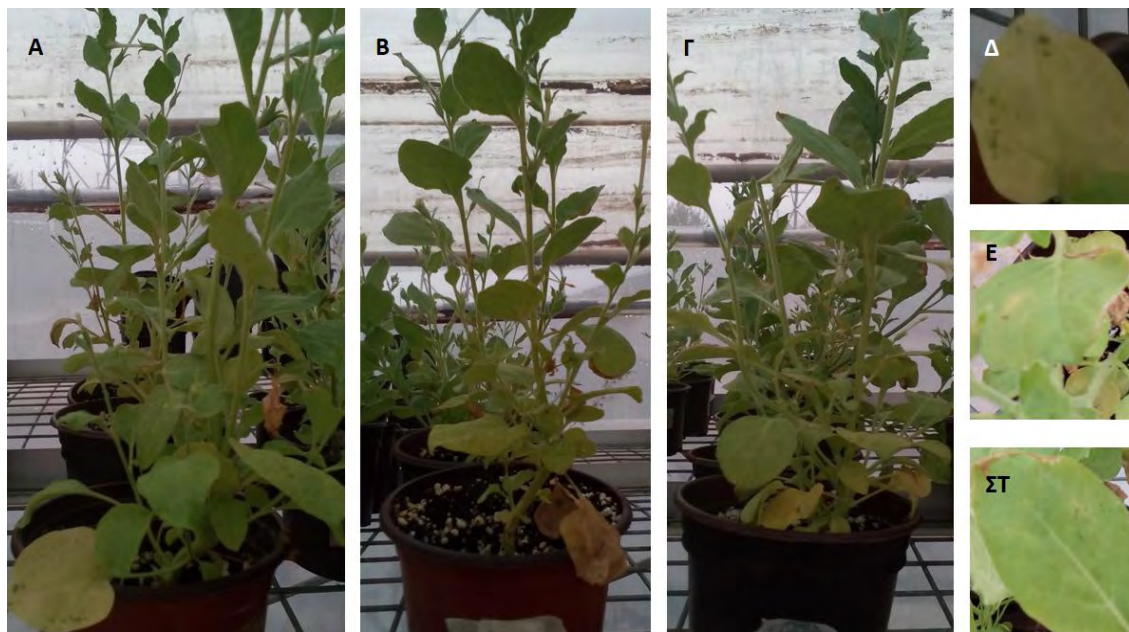
3.2. Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έναντι του βακτηρίου *P. syringae* pv. *tomato*

Στο πλαίσιο αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι της ασθένειας της βακτηριακής κηλίδωσης του καπνού φυτά διαγονιδιακών σειρών (T_2 γενιά) μολύνθηκαν με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000) και στη συνέχεια εκτιμήθηκε η απόκρισή τους σε σύγκριση με φυτά αγρίου τύπου. Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας βασίστηκε σε μακροσκοπικές παρατηρήσεις και σε μεθόδους ποσοτικοποίησης του παθογόνου.

Για τις τεχνητές μολύνσεις με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000), επιλέχθηκαν 5 φυτά από 5 διαφορετικές σειρές. Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες φυτά αγρίου τύπου που μολύνθηκαν με το βακτήριο. Συνολικά αξιολογήθηκαν 25 διαγονιδιακά φυτά και 5 φυτά αγρίου τύπου.

Τα φυτά αγρίου τύπου παρουσίασαν συμπτώματα χλώρωσης σε διάστημα περίπου 4 ημερών μετά τη μόλυνση. Συγκεκριμένα, στο διάστημα αυτό το βακτήριο προκάλεσε την ανάπτυξη μικρού μεγέθους χλωρωτικών κηλίδων στα φύλλα ή ακόμη και εκτεταμένη

χλώρωση της επιφάνειας του ελάσματος των φύλλων, συμπτώματα περιφερειακής νέκρωσης του ελάσματος των φύλλων και, σε ορισμένες περιπτώσεις, συμπτώματα ήπιου αλλά γενικευμένου μαρασμού (Εικόνα 3.5).



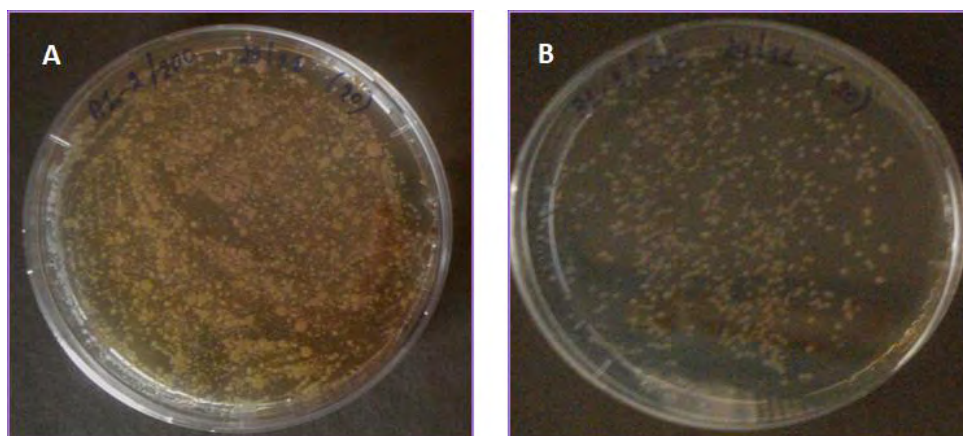
Εικόνα 3.5 Συμπτωματολογία της ασθένειας της βακτηριακής κηλίδωσης, 4 ημέρες μετά από μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000) σε φυτά αγρίου τύπου του είδους *N. benthamiana*. **A, B, Γ** Φυτά με συμπτώματα χλώρωσης και ήπιου μαρασμού. **Δ** Φύλλο με εκτεταμένη χλώρωση στην επιφάνεια του ελάσματος. **Ε, ΣΤ** Συμπτώματα περιφερειακής νέκρωσης του ελάσματος των φύλλων.

Αναφορικά με τα διαγονιδιακά φυτά, εμφάνισαν σαφώς ηπιότερη συμπτωματολογία συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου. Στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση, τα συμπτώματα αφορούσαν σε ήπια και σποραδική χλώρωση του ελάσματος των φύλλων και περιορισμένο αριθμό χλωρωτικών κηλίδων, ενώ απουσίαζαν πλήρως συμπτώματα μαρασμού. Είναι ωστόσο αξιοσημείωτο ότι σε ορισμένα διαγονιδιακά φυτά, 2 ημέρες μετά τη μόλυνση, εμφανίστηκαν νεκρωτικές κηλίδες που πιθανώς συνιστούν την ορατή εκδήλωση της επαγωγής της αντίδρασης υπερευαισθησίας, λόγω της έκφρασης της χαρπίνης HrpZ_{P_{sph}} στον αποπλάστη των φυτών (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6 Συμπτωματολογία της ασθένειας της βακτηριακής κηλίδωσης, έπειτα από μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000) σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* που εκφράζουν το γονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}*. **Α** Διαγονιδιακά φυτά με ήπια συμπτώματα χλώρωσης των φύλλων. **Β** Διαγονιδιακό φυτό με έναρξη δημιουργίας νεκρωτικής κηλίδας, 2 ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο. **Γ** Νεκρωτική κηλίδα, που πιθανώς σχετίζεται με επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR), 4 ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο.

Προκειμένου να αξιολογηθεί συγκριτικά η αποίκηση του βακτηρίου στα διαγονιδιακά και στα φυτά αγρίου τύπου, 4 ημέρες μετά τη μόλυνση λήφθηκαν δείγματα ιστού από τα μολυσμένα φύλλα και διενεργήθηκαν μετρήσεις των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο επιλογής. Η επίστρωση των ομογενοποιημένων εκχυλιδμάτων Pst DC3000-μολυσμένων φύλλων, πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές αραιώσεις (1/10, 1/100, 1/200) ώστε να επιλεγεί η καταλληλότερη προς μέτρηση. Οι επιστρώσεις τρυβλίων έδωσαν πολύ υψηλό αριθμό αποικιών, η καταμέτρηση των οποίων ήταν αδύνατη. Ωστόσο, στην αραιώση 1/200, παρά το μεγάλο αριθμό αποικιών, υπήρξαν ορατές διαφορές, αναφορικά με την αποίκηση του βακτηρίου, μεταξύ των διαγονιδιακών φυτών και των φυτών αγρίου τύπου (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7 Ανάπτυξη αποικιών του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000), από ομογενοποιημένα εκχυλίσματα Pst DC3000-μολυσμένων φύλλων 4 ημέρες μετά από μόλυνση των φυτών του είδους *N. benthamiana*. **A** Αποίκηση του βακτηρίου σε φυτά αγρίου τύπου. **B** Αποίκηση του βακτηρίου σε διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν το γονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}*.

Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα των πειραμάτων υπογραμμίζουν τη διαφορετική απόκριση των διαγονιδιακών φυτών συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου. Οι παρατηρηθείσες διαφορές εκφράζονται με την ηπιότερη και καθυστερημένη ανάπτυξη των συμπτωμάτων της ασθένειας αλλά και με τη μειωμένη αποίκηση του βακτηρίου στα διαγονιδιακά φυτά. Τα ευρήματα αυτά παρέχουν ενδείξεις ότι η ενδογενώς παραγόμενη χαρπίνη στα διαγονιδιακά φυτά οδηγεί σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης και ταυτόχρονα υποδεικνύουν ότι η ανθεκτικότητα πιθανώς σχετίζεται με την επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας.

3.3. Επίδραση του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{P_{sph}}* στη μεταβολική σύσταση των φυτών *N. benthamiana*

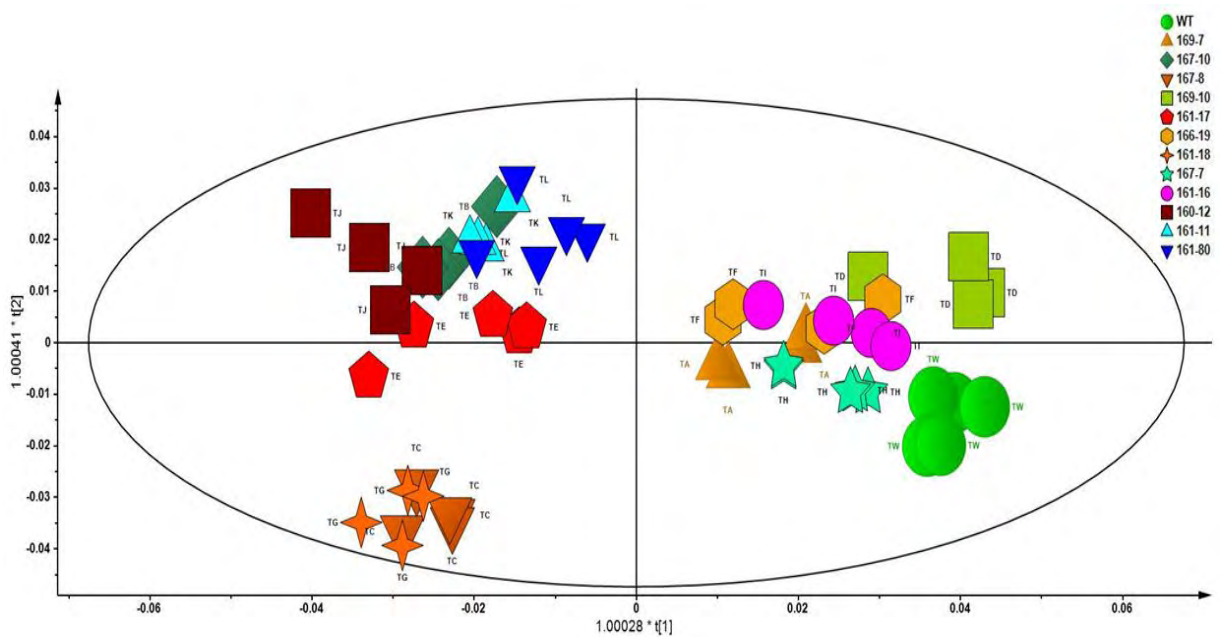
Η ανάλυση του GC / MS μεταβολικού προφίλ του *N. benthamiana* είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση ενός μεγάλου αριθμού μεταβολικών χαρακτηριστικών, εκ των οποίων σημαντικό μέρος ταυτοποιήθηκε, είτε απόλυτα είτε δυνητικά, ενώ για ορισμένους δεν κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση τους.

Το μεταβολικό προφίλ αποτελούνταν στο μεγαλύτερο ποσοστό του από μεταβολίτες που ανήκουν στις χημικές ομάδες των υδατανθράκων, ενώ ένα ποσοστό αυτών ανήκουν σε άλλες ομάδες όπως αμινοξέα, αλκοόλες, αμίνες, καρβοξυλικά οξέα, λιπαρά οξέα, υδατάνθρακες, ανόργανα οξέα, νουκλεϊκά οξέα, παράγωγα φωσφορικού οξέος, πολυαμίνες και γλυκερολιπίδια (Εικόνα 3.8).

Η ανακάλυψη των τάσεων ανάμεσα στις επεμβάσεις και των αντίστοιχων μεταβολιτών-βιοσημαντών βασίστηκε στην εφαρμογή OPLS-DA (Εικόνες 3.8 και 3.9). Στα διαγράμματα απουσιάζουν οι ακραίες τιμές και οι επαναλήψεις είναι καλά ομαδοποιημένες, επιβεβαιώνοντας την αποτελεσματικότητα και επαναληψιμότητα των βιοαναλυτικών πρωτοκόλλων και πρωτοκόλλων βιοπληροφορικής.

Από τα διαγράμματα είναι φανερή η επίδραση του διαγονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* στο μεταβολικό προφίλ του *N. benthamiana*, καθώς προκύπτει ότι στο πλείστο των περιπτώσεων οι βιολογικές επαναλήψεις των διαγονιδιακών σειρών (160-12, 161-11, 161-16, 161-17, 161-18, 161-80, 166-19, 167-7, 167-8, 167-10, 169-7, 169-10) διαφέρουν σημαντικά με τους μάρτυρες-φυτά αγρίου τύπου (wt) (Εικόνα 3.8), επιβεβαιώνοντας ότι το γονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}* επιδρά στο μεταβολισμό του φυτού. Πρέπει να σημειωθεί ότι στα OPLS-DA score plots, οι αποστάσεις μεταξύ των σημείων είναι ανάλογες των διαφορών στα καταγεγραμμένα μεταβολικά προφίλ.

Από την ανάλυση προκύπτει ότι οι βιολογικές επαναλήψεις ορισμένων διαγονιδιακών σειρών ομαδοποιούνται πολύ κοντά, ενώ σε άλλες σειρές εμφανίζεται παραλλακτικότητα (161-80, 161-17). Σύμφωνα με το OPLS-DA score plot, τη μεγαλύτερη ομοιότητα με τα φυτά wt παρουσιάζουν οι διαγονιδιακές σειρές 167-7 και 161-16. Παράλληλα, το μεταβολικό προφίλ ομαδοποιεί ορισμένες σειρές που συνιστούν διαφορετικά συμβάντα γενετικού μετασχηματισμού, όπως οι 161-18 και 167-8. Παρά τη μεταξύ τους ομοιότητα, οι σειρές 161-18 και 167-8 διαφέρουν σημαντικά τόσο από τις υπόλοιπες διαγονιδιακές σειρές όσο και από τα wt φυτά (Εικόνα 3.8).

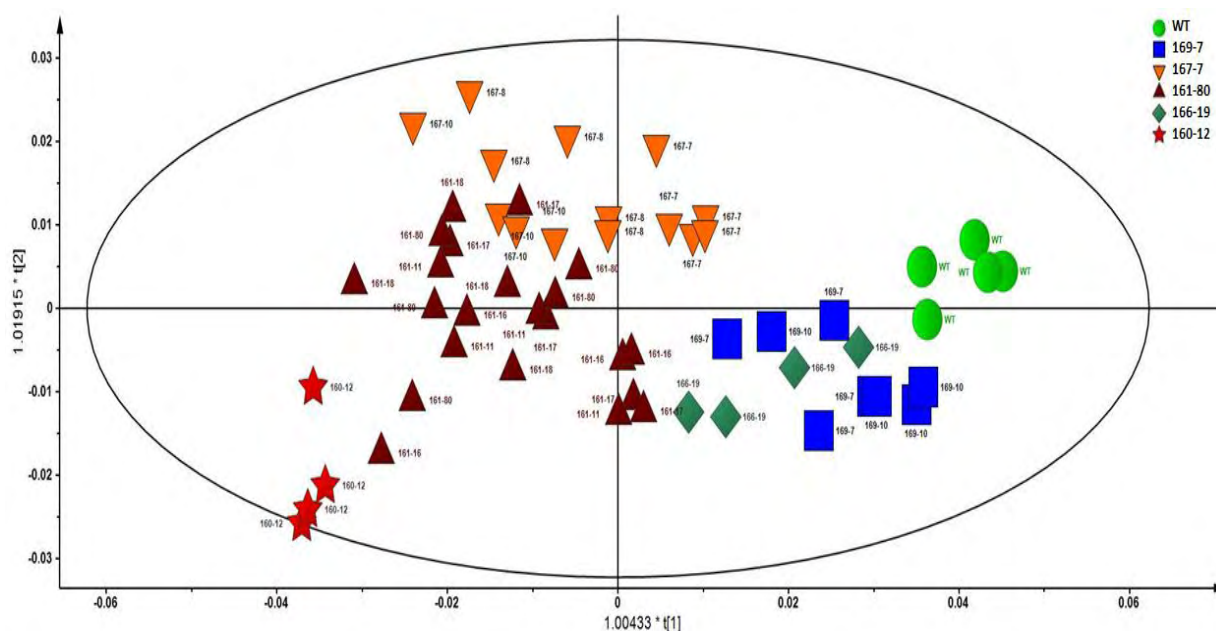


Εικόνα 3.8 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (OPLS-DA score plot) για την επίδραση του διαγονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* στο μεταβολισμό φυτών του είδους *N. benthamiana*. Απεικόνιση του μεταβολισμού διαγονιδιακών φυτών (■ 160-12, ▲ 161-11, ● 161-16, ★ 161-17, ☆ 161-18, ▼ 161-80, ⬡ 166-19, ★ 167-7, ▽ 167-8, ◆ 167-10, ▲ 169-7, ■ 169-10) και φυτών αγρίου τύπου (wt) (●).

Από την ανάλυση προκύπτει ότι οι βιολογικές επαναλήψεις ορισμένων διαγονιδιακών σειρών ομαδοποιούνται πολύ κοντά, ενώ σε άλλες σειρές εμφανίζεται παραλλακτικότητα (161-80, 161-17). Σύμφωνα με το OPLS-DA score plot, τη μεγαλύτερη ομοιότητα με τα φυτά wt παρουσιάζουν οι διαγονιδιακές σειρές 167-7 και 161-16. Παράλληλα, το μεταβολικό προφίλ ομαδοποιεί ορισμένες σειρές που συνιστούν διαφορετικά συμβάντα γενετικού μετασχηματισμού, όπως οι 161-18 και 167-8. Παρά τη μεταξύ τους ομοιότητα, οι σειρές 161-18 και 167-8 διαφέρουν σημαντικά τόσο από τις υπόλοιπες διαγονιδιακές σειρές όσο και από τα wt φυτά (Εικόνα 3.8).

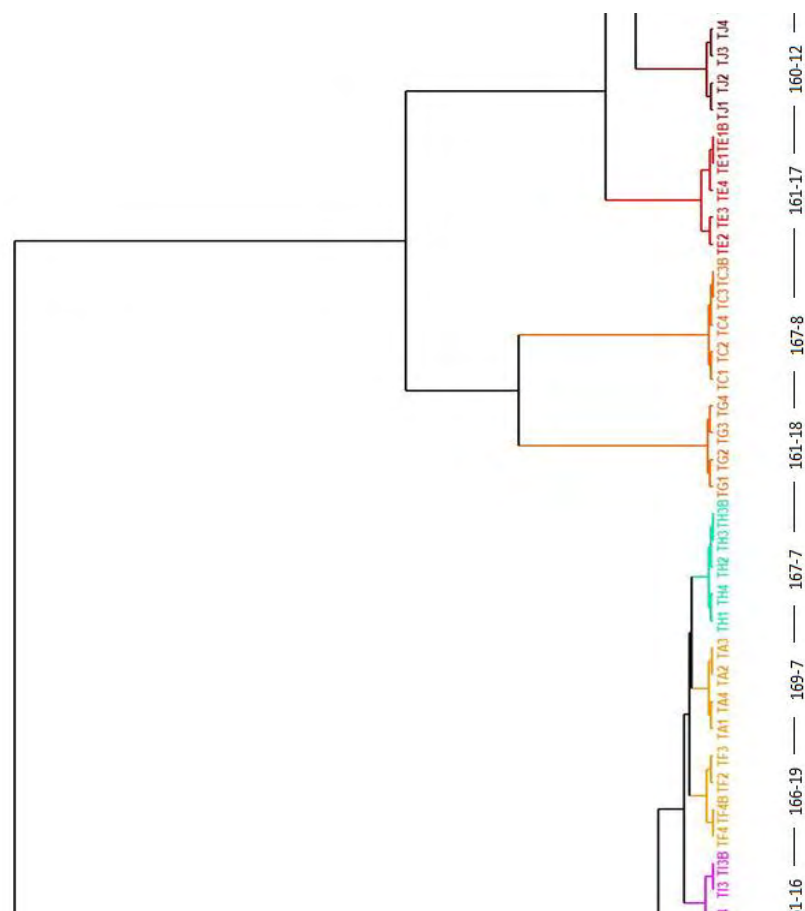
Με στόχο να δοθεί έμφαση στις *hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακές σειρές που συνιστούν διαφορετικά συμβάντα μετασχηματισμού (160-12, 161-80, 166-19, 167-7 και 169-7) δημιουργήθηκε OPLS-DA score plot προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση του *hrpZ_{P_{sph}}* στο μεταβολισμό των φυτών (Εικόνα 3.9). Από την ανάλυση προκύπτει ότι οι βιολογικές επαναλήψεις των wt φυτών διακρίνονται από τις επαναλήψεις των διαγονιδιακών σειρών, υποδεικνύοντας ότι το γονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}* επιδρά σημαντικά στο μεταβολισμό των φυτών. Όπως προαναφέρθηκε σημαντική ομοιότητα παρουσίασαν οι σειρές 161 και 167, ενώ τη

μεγαλύτερη ομοιότητα με τα φυτά αγρίου τύπου εμφάνισαν οι σειρές 166-19 και 169-7 (Εικόνα 3.9).

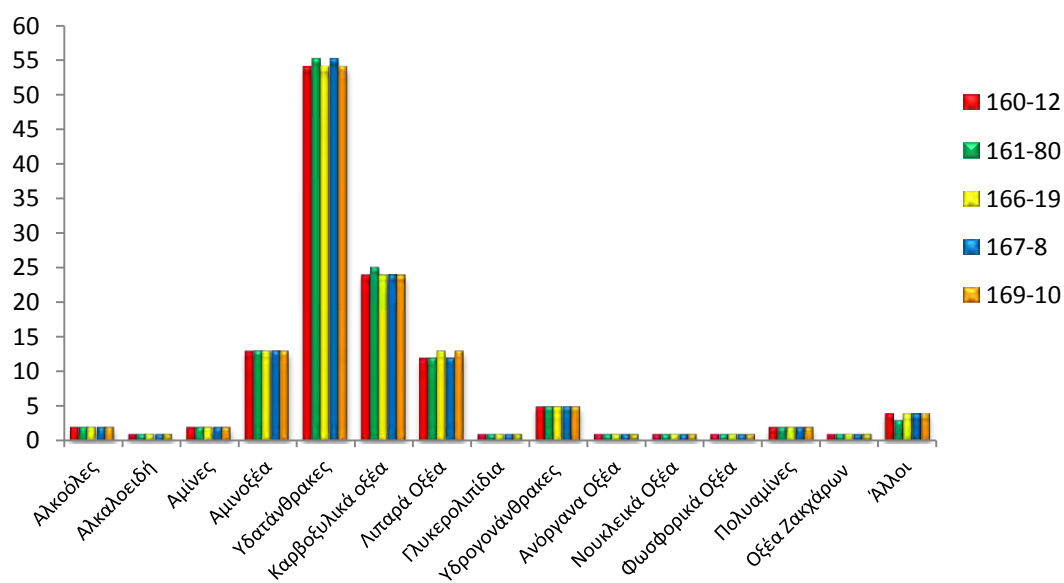


Εικόνα 3.9 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (OPLS-DA score plot) για την επίδραση του διαγονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* στο μεταβολισμό φυτών του είδους *N. benthamiana*. Απεικόνιση του μεταβολισμού διαγονιδιακών φυτών (★ 160-12, ▲ 161-80, ◆ 166-19, ▼ 167-7, ■ 169-7) και φυτών αγρίου τύπου (wt) (●).

Συμπληρωματικά της OPLS-DA πραγματοποιήθηκε ανάλυση ιεραρχικής ανάλυσης κατά συστάδες (Hierarchical cluster analysis) (Εικόνα 3.10). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της OPLS-DA, προκύπτει ξεκάθαρος διαχωρισμός μεταξύ των επαναλήψεων ανάλογα με τις επεμβάσεις (διαφορετικές *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρές). Τη μεγαλύτερη μεταξύ τους ομοιότητα εμφάνισαν οι σειρές 161 και 167 (Εικόνα 3.10)



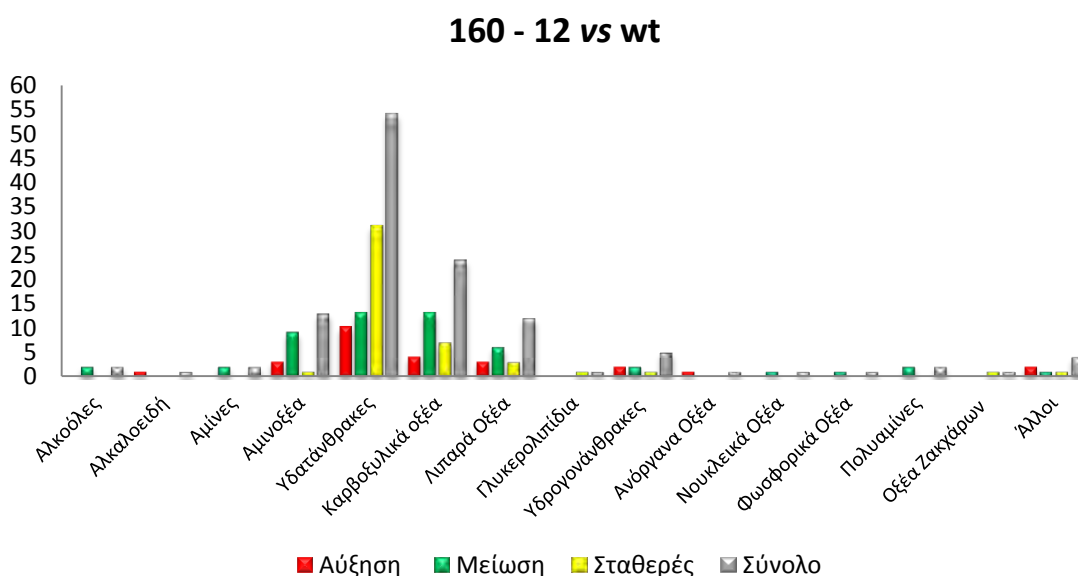
Εικόνα 3.10 Δενδρόγραμμα ιεραρχικής ανάλυσης κατά συστάδες (Hierarchical cluster analysis, HCA dendrogram) των GC/MS μεταβολικών προφίλ των διαγονιδιακών και αγρίου τύπου φυτών, όπου απεικονίζεται η ομαδοποίηση των επεμβάσεων και οι μεταξύ τους αποστάσεις.



Εικόνα 3.11 Σύνοψη της επίδρασης του διαγονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* στο μεταβολικό προφίλ των φυτών *N. benthamiana*. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το συνολικό αριθμό μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν ανά διαγονιδιακή σειρά (160-12, 161-80, 166-19, 167-7 και 169-7). Η κατηγοριοποίηση των μεταβολιτών στις αντίστοιχες μεταβολικές οδούς έγινε βάσει των κωδικών που χρησιμοποιούνται στη βάση δεδομένων KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

Στο σύνολό τους, τα ευρήματα αυτά καθιστούν ξεκάθαρη την επίδραση του *hrpZ_{P_{sph}}* στο μεταβολισμό των φυτών *N. benthamiana*. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα παρέχουν σημαντικές ενδείξεις σχετικά με τη δυνατότητα της μεταβολομικής ανάλυσης να ανιχνεύσει αλλαγές στο μεταβολικό προφίλ οι οποίες σηματοδοτούν τα μεταβολικά δίκτυα στα οποία εμπλέκονται.

Στους Πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται οι μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν στις *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακές σειρές (160-12, 161-80, 166-19, 167-7 και 169-7), ενώ στα Διαγράμματα απεικονίζεται η επίδραση του *SP/hrpZ_{P_{sph}}* στα βιοσυνθετικά μονοπάτια του φυτού *N. benthamiana*.



Εικόνα 3.12 Επίδραση του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{P_{sph}}* στα βιοσυνθετικά μονοπάτια της σειράς 160-12. Στις στήλες δηλώνονται οι μεταβολικοί οδοί, οι μεταβολίτες των οποίων παρουσιάζουν αυξημένη συσσώρευση (κόκκινο), μειωμένη συσσώρευση (πράσινο), απουσία

μεταβολής (κίτρινο), σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου (wt) και το σύνολο αυτών (γκρι). Η κατηγοριοποίηση των μεταβολιτών στις αντίστοιχες μεταβολικές οδούς έγινε βάσει των κωδικών που χρησιμοποιούνται στη βάση δεδομένων KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

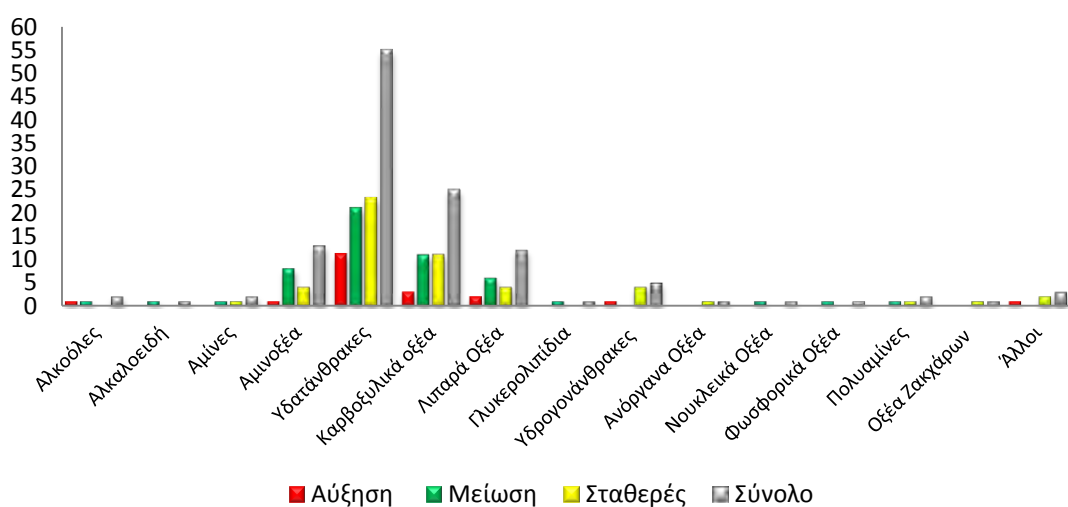
Πίνακας 3.1 Κατηγοριοποίηση μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στη *SP/hrpZ_{psph}*-διαγονιδιακή σειρά 160-12, βάσει της συμμετοχής τους σε βιοσυνθετικά μονοπάτια.

Βιοσυνθετικό Μονοπάτι	Σειρά 160-12	Μεταβολίτες	Λειτουργία
map01230Biosynthesis of amino acids	2	L-Threonine, L-Proline	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00195Photosynthesis	1	Phosphate	Μεταβολισμός Φωσφορικών Οξέων και Παραγώγων
map00960Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	1	Cadaverine	Μεταβολισμός Πολυαμινών και Δυσαμινών
map00970Aminoacyl-tRNA biosynthesis	1	L-Proline	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map01060Biosynthesis of plant secondary metabolites	2	Stearic acid, Octanoic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map01064Biosynthesis of alkaloids derived from ornithine, lysine and nicotinic acid	1	Cadaverine	Μεταβολισμός Πολυαμινών και Δυσαμινών
map01120Microbial metabolism in diverse environments	1	Maleic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map04111Cellcycle-yeast	1	Phosphate	Μεταβολισμός Φωσφορικών Οξέων και Παραγώγων
map00010Glycolysis / Gluconeogenesis	1	b-Lactate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00030Pentose phosphate pathway	5	Deoxyribose, 2-Keto-D-gluconic acid, Gluconolactone, Glyceric acid, D-Ribose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων & Ζαχαρικών Οξέων & Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00040Pentose and glucuronate interconversions	3	Glycerol, Xylose, Xylitol	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων & Μονοζαχαρίτες
map00051Fructose and mannose metabolism	3	b-Lactate, D-Fructose, Sorbitol	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων
map00052Galactose metabolism	5	Glycerol, D-Fructose, Sorbitol, Melibiose, D-Galactose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων
map00053Ascorbate and aldarate metabolism	1	Threonine acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map00061Fatty acid biosynthesis	3	Stearic acid, Octanoic acid, Myristic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map00190Oxidative phosphorylation	1	Phosphate	Μεταβολισμός Φωσφορικών Οξέων και Παραγώγων
map00230Purine metabolism	1	Adenosine	Μεταβολισμός Νουκλεϊκών Οξέων και Νουκλεοτιδίων
map00240Pyrimidine metabolism	2	Malonic acid, Carbamic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00250Alanine, aspartate and glutamate metabolism	1	GABA	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00260Glycine, serine and threonine metabolism	2	Glyceric acid, L-Threonine	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00261Monobactam biosynthesis	1	L-Threonine	Μεταβολισμός Αμινοξέων

map00270Cysteine and methionine metabolism	1	2-Ethylhexyl hexyl sulfite	Μεταβολισμός Ανόργανων Οξέων και Σουλφιδικών Οξέων
map00290Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	1	L-Threonine	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00310Lysine degradation	1	Cadaverine	Μεταβολισμός Πολυαμινών και Δυαμινών
map00330Arginine and proline metabolism	2	GABA, L-Proline	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00350Tyrosine metabolism	1	Maleic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00410beta-Alanine metabolism	2	Malonic acid, GABA	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00430Taurine and hypotaurine metabolism	1	2-Ethylhexyl hexyl sulfite	Μεταβολισμός Ανόργανων Οξέων και Σουλφιδικών Οξέων
map00480Glutathione metabolism	1	Cadaverine	Μεταβολισμός Πολυαμινών και Δυαμινών
map00500Starch and sucrose metabolism	2	D-Fructose, a,a-Trehalose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων & Διζακχαριτών
map00520Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	1	Xylose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και Μονοζακχαριτών
map00561Glycerolipid metabolism	3	Glycerol, Glyceric acid, Glycerol-3-phosphate	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων & Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00562Inositol phosphate metabolism	1	D-Myo-inositol-5-phosphate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00564Glycerophospholipid metabolism	1	Ethanolamine	Μεταβολισμός Αμινών
map00592alpha-Linolenic acid metabolism	1	a-Linolenic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map00620Pyruvate metabolism	1	b-Lactate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00630Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	2	Glyceric acid, Tartaric acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων
map00640Propanoate metabolism	1	b-Lactate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00643Styrene	1	b-Lactate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00650Butanoate metabolism	3	GABA, Maleic acid, Butyric acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00680Methane metabolism	1	Glyceric acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00710Carbon fixation in photosynthetic organisms	1	Sedoheptulose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων
map00760Nicotinate and nicotinamide metabolism	2	GABA, Maleic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00910Nitrogen metabolism	1	Carbamic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00920Sulfur metabolism	1	2-Ethylhexyl hexyl sulfite	Μεταβολισμός Ανόργανων Οξέων και Σουλφιδικών Οξέων
map00930 Caprolactam degradation	1	Adipic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00940Phenylpropanoid biosynthesis	1	Caffeic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00970Aminoacyl-tRNA biosynthesis	1	L-Threonine	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map01040Biosynthesis of unsaturated fatty acids	3	Stearic acid, a-Linolenic acid, Arachidic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map01060Biosynthesis of plant secondary metabolites	1	a-Linolenic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map01061Biosynthesis of phenylpropanoids	1	Caffeic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map01066Biosynthesis of alkaloids derived from terpenoid and polyketide	1	Octanoic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map01070Biosynthesis of plant hormones	1	a-Linolenic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων

map01100Metabolic pathways	10	Xylose, Xylitol, Sorbitol, D-Galactose, Phosphate, 2-Ethylhexyl hexyl sulfite, a,a-Trehalose, Glycerol-3-phosphate, D-Myo-inositol-5-phosphate, Caffeic acid	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων & Μονοζαχαρίτες & Διζαχαριτών & Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων & Μεταβολισμός Ανόργανων Οξέων και Σουλφιδικών Οξέων & Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map01110Biosynthesis of secondary metabolites, Caffeic acid	4	b-Lactate, Glyceric acid, a,a-Trehalose, Glycerol-3-phosphate	Μεταβολισμός Υδατανθράκων & Διζαχαριτών & Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map01120Microbial metabolism in diverse environments	2	D-Fructose, 2-Ethylhexyl hexyl sulfite	Μεταβολισμός Υδατανθράκων & Μεταβολισμός Ανόργανων Οξέων και Σουλφιδικών Οξέων
map01220Degradation of aromatic compounds	1	Caffeic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map02010ABC transporters	13	D-Ribose, Glycerol, Xylose, Xylitol, D-Fructose, Sorbitol, Melibiose, L-Threonine, L-Proline, a,a-Trehalose, Glycerol-3-phosphate, , Phosphate, Erythritol	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων & Μονοζαχαριτών & Διζαχαριτών & Μεταβολισμός Αμινοξέων & Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων
map02020Two-componentsystem	1	Phosphate	Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων
map02024Quorumsensing	1	Phosphate	Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων
map02030Bacterial chemotaxis	1	D-Galactose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων
map02060Phosphotransferase system (PTS)	2	Sorbitol, D-Galactose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων
map04070Phosphatidylinositol signaling system	1	D-Myo-inositol-5-phosphate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map04973Carbohydrate digestion and absorption	1	D-Galactose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων
map04978Mineral absorption	2	D-Galactose, Phosphate	Μεταβολισμός Υδατανθράκων & Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων
map05012Parkinson'sdisease	1	Phosphate	Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων
map05231Choline metabolism in cancer	1	Glycerol-3-phosphate	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων

161 - 80 vs wt



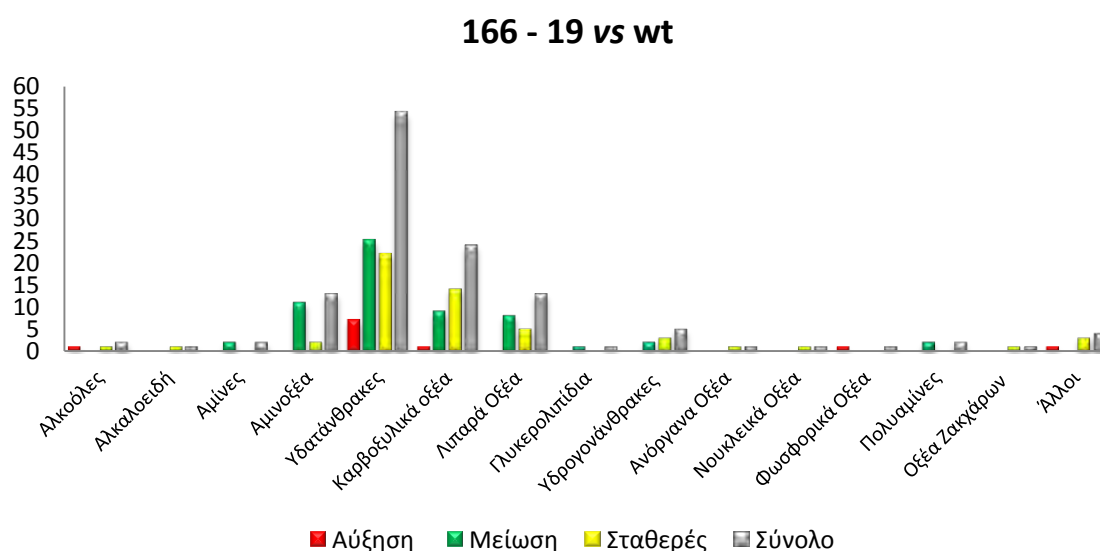
Εικόνα 3.13 Επίδραση του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{P_{sph}}* στα βιοσυνθετικά μονοπάτια της σειράς 161-80. Στις στήλες δηλώνονται οι μεταβολικοί οδοί, οι μεταβολίτες των οποίων παρουσιάζουν αυξημένη συσσώρευση (κόκκινο), μειωμένη συσσώρευση (πράσινο), απουσία μεταβολής (κίτρινο), σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου (wt) και το σύνολο αυτών (γκρι). Η κατηγοριοποίηση των μεταβολιτών στις αντίστοιχες μεταβολικές οδούς έγινε βάσει των κωδικών που χρησιμοποιούνται στη βάση δεδομένων KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

Πίνακας 3.2 Κατηγοριοποίηση μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στη *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακή σειρά 161-80, βάσει της συμμετοχής τους σε βιοσυνθετικά μονοπάτια.

Βιοσυνθετικό Μονοπάτι	Σειρά 161-80	Μεταβολίτες	Λειτουργία
map01230Biosynthesis of amino acids	1	L-Threonine, L-Proline	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00010Glycolysis / Gluconeogenesis	1	b-Lactate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00030Pentose phosphate pathway	5	Deoxyribose, 2-Keto-D-gluconic acid, Glyceric acid, D-Ribose, Gluconolactone	Μεταβολισμός Υδατανθράκων & Καρβοξυλικών Οξέων
map00040Pentose and glucuronate interconversions	3	Glycerol, Xylose, Xylitol	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων & Μονοσακχαριτών
map00051Fructose and mannose metabolism	3	b-Lactate, D-Fructose, Sorbitol	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων και παραγώγων & Μεταβολισμός Υδατανθράκων
map00052Galactose metabolism	5	Glycerol, D-Fructose, Sorbitol, Melibiose, D-Galactose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων
map00053Ascorbate and aldarate metabolism	1	Threonic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map00061Fatty acid biosynthesis	2	Stearic acid, Octanoic acid, Myristic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map00190Oxidative phosphorylation	1	Phosphate	Μεταβολισμός Φωσφορικών Οξέων και Παραγώγων
map00195Photosynthesis	1	Phosphate	Μεταβολισμός Φωσφορικών Οξέων και Παραγώγων
map00230Purine metabolism	1	Adenosine	Μεταβολισμός Νουκλεϊκών Οξέων και Νουκλεοτιδίων
map00240Pyrimidine metabolism	2	Malonic acid, Carbamic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00250Alanine, aspartate and glutamate metabolism	1	GABA	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00260Glycine, serine and threonine metabolism	2	Glyceric acid, L-Threonine	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00261Monobactam biosynthesis	1	L-Threonine	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00270Cysteine and methionine metabolism	1	2-Ethylhexyl hexyl sulfite	Μεταβολισμός Ανόργανων Οξέων και Σουλφιδικών Οξέων
map00290Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	1	L-Threonine	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00310Lysine degradation	1	Cadaverine	Μεταβολισμός Πολυαμινών και Δυσαμινών
map00330Arginine and proline metabolism	2	GABA, L-Proline	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00350Tyrosine metabolism	1	Maleic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00410beta-Alanine metabolism	2	Malonic acid, GABA	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00430Taurine and hypotaurine metabolism	1	2-Ethylhexyl hexyl sulfite	Μεταβολισμός Ανόργανων Οξέων και Σουλφιδικών Οξέων
map00480Glutathione metabolism	1	Cadaverine	Μεταβολισμός Πολυαμινών και Δυσαμινών

map00500Starch and sucrose metabolism	2	D-Fructose, a,a-Trehalose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων & Διζακχαριτών
map00520Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	3	Xylose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και Μονοζακχαριτών
map00561Glycerolipid metabolism	1	Glyceric acid, Glycerol, Glycerol-3-phosphate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων
map00562Inositol phosphate metabolism	1	D-Myo-inositol-5-phosphate	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων φωσφορικών οξέων
map00564Glycerophospholipid metabolism	1	Ethanolamine	Μεταβολισμός Αμινών
map00592alpha-Linolenic acid metabolism	1	a-Linolenic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map00620Pyruvate metabolism	1	b-Lactate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00630Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	2	Glyceric acid, Tartaric acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων
map00640Propanoate metabolism	2	b-Lactate, Glycerol-3-phosphate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων
map00643Styrene degradation	1	b-Lactate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00650Butanoate metabolism	3	GABA, Maleic acid, Butyric acid	Μεταβολισμός Αμινοξέων & Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00680Methane metabolism	1	Glyceric acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00710Carbon fixation in photosynthetic organisms	1	Sedoheptulose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων
map00760Nicotinate and nicotinamide metabolism	2	GABA, Maleic acid	Μεταβολισμός Αμινοξέων & Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00910Nitrogen metabolism	1	Carbamic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00920Sulfur metabolism	1	2-Ethylhexyl hexyl sulfite	Μεταβολισμός Ανόργανων Οξέων και Σουλφιδικών Οξέων
map00930 Caprolactam degradation	1	Adipic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων και Φαινυλανοπροπανοειδών
map00940Phenylpropanoid biosynthesis	1	Caffeic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00960Tropane	1	Cadaverine	Μεταβολισμός Πολυαμινών και Δυσαμινών
map00970Aminoacyl-tRNA biosynthesis	2	L-Threonine, L-Proline	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map01040Biosynthesis of unsaturated fatty acids	4	Stearic acid, Octanoic acid, a-Linolenic acid, Arachidic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map01060Biosynthesis of plant secondary metabolites	3	Stearic acid, Octanoic acid, a-Linolenic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map01061Biosynthesis of phenylpropanoids	1	Caffeic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map01064Biosynthesis of alkaloids derived from ornithine, lysine and nicotinic acid	1	Cadaverine	Μεταβολισμός Πολυαμινών και Δυσαμινών
map01066Biosynthesis of alkaloids derived from terpenoid and polyketide	1	Octanoic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map01070Biosynthesis of plant hormones	1	a-Linolenic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map01100Metabolic pathways	9	Xylitol, Sorbitol, D-Galactose, Myristic acid, Phosphate, 2-Ethylhexyl hexyl sulfite, Glycerol-3-phosphate, D-Myo-inositol-5-phosphate, Caffeic acid	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων και παραγώγων φωσφορικών οξέων & Μεταβολισμός Υδατανθράκων & Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων & Μεταβολισμός Φωσφορικών Οξέων και Παραγώγων & Μεταβολισμός Ανόργανων Οξέων και Σουλφιδικών Οξέων & Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map01110Biosynthesis of secondary metabolites, Caffeic acid	6	b-Lactate, Glyceric acid, Gluconolactone, Xylose, Glycerol-3-phosphate, Caffeic acid	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων & Ζακχαρικών Οξέων & Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map01120Microbial metabolism in diverse environments	4	Gluconolactone, D-Fructose, 2-Ethylhexyl hexyl sulfite, Maleic acid	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και Ζακχαρικών Οξέων & Μεταβολισμός Ανόργανων Οξέων και Σουλφιδικών Οξέων & Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map01130Biosynthesis of antibiotics	2	Gluconolactone, L-Threonine	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και Ζακχαρικών Οξέων & Μεταβολισμός Αμινοξέων
map01200Carbon metabolism	1	Gluconolactone	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και Ζακχαρικών Οξέων
map01220Degradation of aromatic compounds	1	Caffeic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων

map02010ABC transporters	13	D-Ribose, Glycerol, Xylose, Xylitol, D-Fructose, Sorbitol, Melibiose, Phosphate, L-Threonine, L-Proline, a,a-Trehalose, Glycerol-3-phosphate, Erythritol	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων & Μονοζαχαριτών & Διζαχαριτών & Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων & Μεταβολισμός Αμινοξέων &
map02020Two-componentsystem	1	Phosphate	Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων
map02024Quorumsensing	1	Phosphate	Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων
map02030Bacterial chemotaxis	1	D-Galactose	
map02060Phosphotransferase system (PTS)	3	Sorbitol, D-Galactose, a,a-Trehalose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων & Διζαχαριτών
map04070Phosphatidylinositol signaling system	1	D-Myo-inositol-5-phosphate	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων φωσφορικών οξέων
map04111Cellcycle-yeast	1	Phosphate	Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων
map04973Carbohydrate digestion and absorption	1	D-Galactose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων
map04978Mineral absorption	2	D-Galactose, Phosphate	Μεταβολισμός Υδατανθράκων & Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων
map05012Parkinson'sdisease	1	Phosphate	Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων
map05231Choline metabolism in cancer	1	Glycerol-3-phosphate	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων



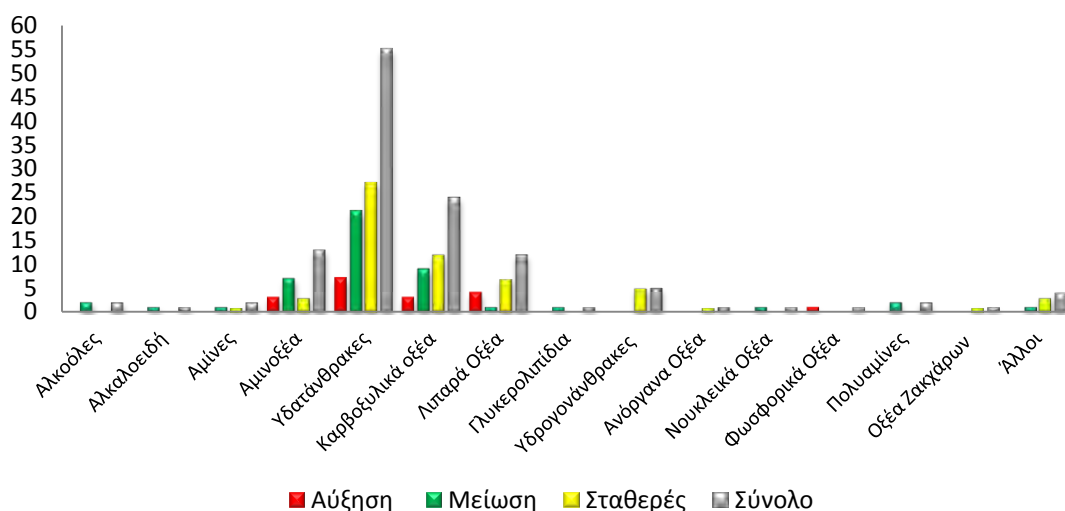
Εικόνα 3.14 Επίδραση του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{P_{spH}}* στα βιοσυνθετικά μονοπάτια της σειράς 166-19. Στις στήλες δηλώνονται οι μεταβολικοί οδοί, οι μεταβολίτες των οποίων παρουσιάζουν αυξημένη συσσώρευση (κόκκινο), μειωμένη συσσώρευση (πράσινο), απουσία μεταβολής (κίτρινο), σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου (wt) και το σύνολο αυτών (γκρι). Η κατηγοριοποίηση των μεταβολιτών στις αντίστοιχες μεταβολικές οδούς έγινε βάσει των κωδικών που χρησιμοποιούνται στη βάση δεδομένων KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

Πίνακας 3.3 Κατηγοριοποίηση μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στη *SP/hrpZ_{Psph}*-διαγονιδιακή σειρά 166-19, βάσει της συμμετοχής τους σε βιοσυνθετικά μονοπάτια.

Βιοσυνθετικό Μονοπάτι	Σειρά 166 - 19	Μεταβολίτες	Λειτουργία
map01230Biosynthesis of amino acids	2	L-Threonine, L-Proline	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00010Glycolysis / Gluconeogenesis	1	b-Lactate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00030Pentose phosphate pathway	5	Deoxyribose, 2-Keto-D-gluconic acid, Glyceric acid, D-Ribose, Gluconolactone	Μεταβολισμός Υδατανθράκων & Καρβοξυλικών Οξέων
map00040Pentose and glucuronate interconversions	3	Glycerol, Xylose, Xylitol	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων & Μονοζαχαριτών
map00051Fructose and mannose metabolism	3	b-Lactate, D-Fructose, Sorbitol	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων και παραγώγων & Μεταβολισμός Υδατανθράκων
map00052Galactose metabolism	5	Glycerol, D-Fructose, Sorbitol, Melibiose, D-Galactose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων
map00053Ascorbate and aldarate metabolism	1	Threonic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map00061Fatty acid biosynthesis	3	Stearic acid, Octanoic acid, Myristic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map00190Oxidative phosphorylation	1	Phosphate	Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων
map00195Photosynthesis	1	Phosphate	Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων
map00230Purine metabolism	1	Adenosine	Μεταβολισμός Νουκλεϊκών Οξέων και Νουκλεοτιδίων
map00240Pyrimidine metabolism	2	Malonic acid, Carbamic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00250Alanine, aspartate and glutamate metabolism	1	GABA	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00260Glycine, serine and threonine metabolism	2	Glyceric acid, L-Threonine	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00261Monobactam biosynthesis	1	L-Threonine	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00270Cysteine and methionine metabolism	1	2-Ethylhexyl hexyl sulfite	Μεταβολισμός Ανόργανων Οξέων και Σουλφιδικών Οξέων
map00290Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	1	L-Threonine	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00310Lysine degradation	1	Cadaverine	Μεταβολισμός Πολυαμινών και Δυσμινών
map00330Arginine and proline metabolism	2	GABA, L-Proline	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00350Tyrosine metabolism	1	Maleic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00410beta-Alanine metabolism	2	Malonic acid, GABA	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00430Taurine and hypotaurine metabolism	1	2-Ethylhexyl hexyl sulfite	Μεταβολισμός Ανόργανων Οξέων και Σουλφιδικών Οξέων
map00480Glutathione metabolism	1	Cadaverine	Μεταβολισμός Πολυαμινών και Δυσμινών
map00500Starch and sucrose metabolism	1	D-Fructose, a,a-Trehalose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων & Διζαχαριτών
map00520Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	1	Xylose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και Μονοζαχαριτών
map00561Glycerolipid metabolism	3	Glyceric acid, Glycerol, Glycerol-3-phosphate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων
map00562Inositol phosphate metabolism	1	D-Myo-inositol-5-phosphate	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων φωσφορικών οξέων
map00564Glycerophospholipid metabolism	1	Glycerol-3-phosphate, Ethanolamine	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων & Αμινών
map00592alpha-Linolenic acid metabolism	1	a-Linolenic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map00620Pyruvate metabolism	1	b-Lactate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων

map00630Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	2	Glyceric acid, Tartaric acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων
map00640Propanoate metabolism	1	b-Lactate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00643Styrene degradation	1	b-Lactate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00650Butanoate metabolism	3	GABA, Maleic acid, Butyric acid	Μεταβολισμός Αμινοξέων & Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00680Methane metabolism	1	Glyceric acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00710Carbon fixation in photosynthetic organisms	1	Sedoheptulose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων
map00760Nicotinate and nicotinamide metabolism	2	GABA, Maleic acid	Μεταβολισμός Αμινοξέων & Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00910Nitrogen metabolism	1	Carbamic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00920Sulfur metabolism	1	2-Ethylhexyl hexyl sulfite	Μεταβολισμός Ανόργανων Οξέων και Σουλφιδικών Οξέων
map00930 Caprolactam degradation	1	Adipic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων και Φαινυλανοπροπανοειδών
map00940Phenylpropanoid biosynthesis	1	Caffeic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00960Tropene	1	Cadaverine	Μεταβολισμός Πολυαμινών και Δυσαμινών
map00970Aminoacyl-tRNA biosynthesis	2	L-Threonine, L-Proline	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map01040Biosynthesis of unsaturated fatty acids	3	Stearic acid, a-Linolenic acid, Arachidic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map01060Biosynthesis of plant secondary metabolites	3	Stearic acid, Octanoic acid, a-Linolenic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map01061Biosynthesis of phenylpropanoids	1	Caffeic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map01064Biosynthesis of alkaloids derived from ornithine, lysine and nicotinic acid	1	Cadaverine	Μεταβολισμός Πολυαμινών και Δυσαμινών
map01066Biosynthesis of alkaloids derived from terpenoid and polyketide	1	Octanoic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map01070Biosynthesis of plant hormones	1	a-Linolenic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map01100Metabolic pathways	10	b-Lactate, Xylose, Xylitol, Sorbitol, Myristic acid, Phosphate, 2-Ethylhexyl hexyl sulfite, Glycerol-3-phosphate, D-Myo-inositol-5-phosphate, Caffeic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων & Μονοζαχαριτών & Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων & Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων & Μεταβολισμός Ανόργανων Οξέων και Σουλφιδικών Οξέων
map01110Biosynthesis of secondary metabolites, Caffeic acid	7	b-Lactate, Glyceric acid, Gluconolactone, D-Galactose, 2-Ethylhexyl hexyl sulfite, Glycerol-3-phosphate, Caffeic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων και Ζαχαρικών Οξέων & Μεταβολισμός Ανόργανων Οξέων και Σουλφιδικών Οξέων
map01120Microbial metabolism in diverse environments	3	Gluconolactone, D-Fructose, Maleic acid	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και Ζαχαρικών Οξέων & Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map01130Biosynthesis of antibiotics	1	Gluconolactone	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και Ζαχαρικών Οξέων
map01200Carbon metabolism	1	Gluconolactone	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και Ζαχαρικών Οξέων
map01220Degradation of aromatic compounds	1	Caffeic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map02010ABC transporters	13	D-Ribose, Glycerol, Xylose, Xylitol, D-Fructose, Sorbitol, Melibiose, Phosphate, L-Threonine, L-Proline, a,a-Trehalose, Glycerol-3-phosphate, Erythritol	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων & Μονοζαχαριτών & Διζαχαριτών & Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων & Μεταβολισμός Αμινοξέων
map02030Bacterial chemotaxis	1	D-Galactose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων
map02060Phosphotransferase system (PTS)	3	Sorbitol, D-Galactose, a,a-Trehalose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων & Διζαχαριτών
map04070Phosphatidylinositol signaling system	1	D-Myo-inositol-5-phosphate	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων φωσφορικών οξέων
map04973Carbohydrate digestion and absorption	1	D-Galactose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων
map04978Mineral absorption	1	D-Galactose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων

167 - 8 vs wt



Εικόνα 3.15 Επίδραση του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{P_{sph}}* στα βιοσυνθετικά μονοπάτια της σειράς 167-8. Στις στήλες δηλώνονται οι μεταβολικοί οδοί, οι μεταβολίτες των οποίων παρουσιάζουν αυξημένη συσσώρευση (κόκκινο), μειωμένη συσσώρευση (πράσινο), απουσία μεταβολής (κίτρινο), σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου (wt) και το σύνολο αυτών (γκρι). Η κατηγοριοποίηση των μεταβολιτών στις αντίστοιχες μεταβολικές οδούς έγινε βάσει των κωδικών που χρησιμοποιούνται στη βάση δεδομένων KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

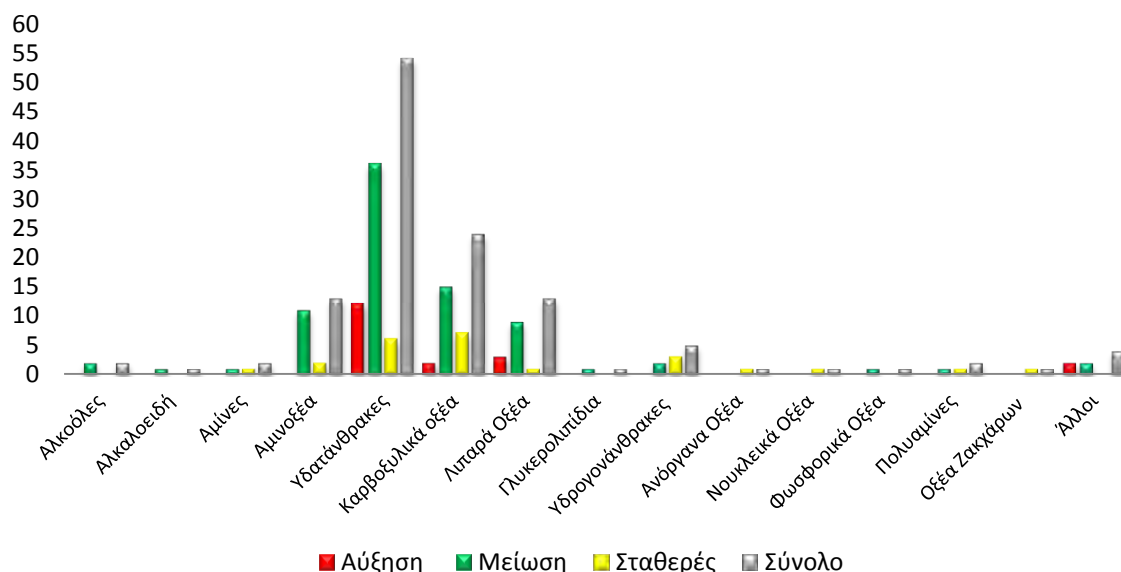
Πίνακας 3.4 Κατηγοριοποίηση μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στη *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακή σειρά 167-8, βάσει της συμμετοχής τους σε βιοσυνθετικά μονοπάτια.

Βιοσυνθετικό Μονοπάτι	Σειρά 167 - 8	Μεταβολίτες	Λειτουργία
map01230Biosynthesis of amino acids	2	L-Threonine, L-Proline	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00010Glycolysis / Gluconeogenesis	1	b-Lactate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00030Pentose phosphate pathway	5	Deoxyribose, 2-Keto-D-gluconic acid, Glyceric acid, D-Ribose, Gluconolactone	Μεταβολισμός Υδατανθράκων & Καρβοξυλικών Οξέων
map00040Pentose and glucuronate interconversions	3	Glycerol, Xylose, Xylitol	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων & Μονοζαχαριτών
map00051Fructose and mannose metabolism	3	b-Lactate, D-Fructose, Sorbitol	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων και παραγώγων & Μεταβολισμός Υδατανθράκων
map00052Galactose metabolism	5	Glycerol, D-Fructose, Sorbitol, Melibiose, D-Galactose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων
map00053Ascorbate and aldarate metabolism	1	Threonic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων

map00061 Fatty acid biosynthesis	3	Stearic acid, Octanoic acid, Myristic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map00190 Oxidative phosphorylation	1	Phosphate	Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων
map00195 Photosynthesis	1	Phosphate	Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων
map00230 Purine metabolism	1	Adenosine	Μεταβολισμός Νουκλεϊκών Οξέων και Νουκλεοτιδίων
map00240 Pyrimidine metabolism	2	Malonic acid, Carbamic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00250 Alanine, aspartate and glutamate metabolism	1	GABA	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00260 Glycine, serine and threonine metabolism	2	Glyceric acid, L-Threonine	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00261 Monobactam biosynthesis	1	L-Threonine	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00270 Cysteine and methionine metabolism	1	2-Ethylhexyl hexyl sulfite	Μεταβολισμός Ανόργανων Οξέων και Σουλφιδικών Οξέων
map00290 Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	1	L-Threonine	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00310 Lysine degradation	1	Cadaverine	Μεταβολισμός Πολυαμινών και Δυσαμινών
map00330 Arginine and proline metabolism	2	GABA, L-Proline	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00350 Tyrosine metabolism	1	Maleic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00410 beta-Alanine metabolism	2	Malonic acid, GABA	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00430 Taurine and hypotaurine metabolism	1	2-Ethylhexyl hexyl sulfite	Μεταβολισμός Ανόργανων Οξέων και Σουλφιδικών Οξέων
map00480 Glutathione metabolism	1	Cadaverine	Μεταβολισμός Πολυαμινών και Δυσαμινών
map00500 Starch and sucrose metabolism	2	D-Fructose, α,α-Trehalose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων & Διζακχαριτών
map00520 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	1	Xylose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και Μονοζακχαριτών
map00561 Glycerolipid metabolism	3	Glyceric acid, Glycerol, Glycerol-3-phosphate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων
map00562 Inositol phosphate metabolism	1	D-Myo-inositol-5-phosphate	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων φωσφορικών οξέων
map00564 Glycerophospholipid metabolism	2	Glycerol-3-phosphate, Ethanolamine	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων & Αμινών
map00592 alpha-Linolenic acid metabolism	1	α-Linolenic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map00620 Pyruvate metabolism	1	b-Lactate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00630 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	2	Glyceric acid, Tartaric acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων
map00640 Propanoate metabolism	1	b-Lactate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00643 Styrene degradation	1	b-Lactate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00650 Butanoate metabolism	3	GABA, Maleic acid, Butyric acid	Μεταβολισμός Αμινοξέων & Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00680 Methane metabolism	1	Glyceric acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00710 Carbon fixation in photosynthetic organisms	1	Sedoheptulose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων
map00760 Nicotinate and nicotinamide metabolism	2	GABA, Maleic acid	Μεταβολισμός Αμινοξέων & Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00910 Nitrogen metabolism	1	Carbamic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00920 Sulfur metabolism	1	2-Ethylhexyl hexyl sulfite	Μεταβολισμός Ανόργανων Οξέων και Σουλφιδικών Οξέων
map00930 Caprolactam degradation	1	Adipic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων και Φαινυλανοπροπανοειδών
map00940 Phenylpropanoid biosynthesis	1	Caffeic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00960 Tropane	1	Cadaverine	Μεταβολισμός Πολυαμινών και Δυσαμινών
map00970 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	2	L-Threonine, L-Proline	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map01040 Biosynthesis of unsaturated fatty acids	3	Stearic acid, α-Linolenic acid, Arachidic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map01060 Biosynthesis of plant secondary metabolites	3	Stearic acid, Octanoic acid, α-Linolenic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων

map01061Biosynthesis of phenylpropanoids	1	Caffeic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map01064Biosynthesis of alkaloids derived from ornithine, lysine and nicotinic acid	1	Cadaverine	Μεταβολισμός Πολυαμινών και Δυαμινών
map01066Biosynthesis of alkaloids derived from terpenoid and polyketide	1	Octanoic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map01070Biosynthesis of plant hormones	1	a-Linolenic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων
map01100Metabolic pathways	12	b-Lactate, Xylose, Xylitol, Sorbitol, D-Galactose, Myristic acid, Phosphate, 2-Ethylhexyl hexyl sulfite, Glycerol-3-phosphate, D-Myo-inositol-5-phosphate, Ethanolamine, Caffeic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων & Μονοζαχαριτών & Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων και Παραγώγων & Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων & Μεταβολισμός Ανόργανων Οξέων και Σουλφιδικών Οξέων & Μεταβολισμός Αμινών
map01110Biosynthesis of secondary metabolites, Caffeic acid, Glycerol-3-phosphate	4	b-Lactate, Glyceric acid, Gluconolactone, Caffeic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Υδατανθράκων και Ζαχαρικών Οξέων
map01120Microbial metabolism in diverse environments	4	Gluconolactone, D-Fructose, 2-Ethylhexyl hexyl sulfite, Maleic acid	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και Ζαχαρικών Οξέων & Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Ανόργανων Οξέων και Σουλφιδικών Οξέων
map01130Biosynthesis of antibiotics	1	Gluconolactone	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και Ζαχαρικών Οξέων
map01200Carbon metabolism	1	Gluconolactone	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και Ζαχαρικών Οξέων
map01220Degradation of aromatic compounds	1	Caffeic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map02010ABC transporters	13	D-Ribose, Glycerol, Xylose, Xylitol, D-Fructose, Sorbitol, Melibiose, Phosphate, L-Threonine, L-Proline, a,a-Trehalose, Glycerol-3-phosphate, Erythritol	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων & Μονοζαχαριτών & Διζαχαριτών & Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων & Μεταβολισμός Αμινοξέων
map02020Two-componentsystem	1	Phosphate	Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων
map02024Quorumsensing	1	Phosphate	Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων
map02030Bacterial chemotaxis	1	D-Galactose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων
map02060Phosphotransferase system (PTS)	3	Sorbitol, D-Galactose, a,a-Trehalose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων & Διζαχαριτών
map04070Phosphatidylinositol signaling system	1	D-Myo-inositol-5-phosphate	Μεταβολισμός Υδατανθράκων και παραγώγων φωσφορικών οξέων
map04111Cellcycle-yeast	1	Phosphate	Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων
map04973Carbohydrate digestion and absorption	1	D-Galactose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων
map04978Mineral absorption	2	D-Galactose, Phosphate	Μεταβολισμός Υδατανθράκων & Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων
map05012Parkinson'sdisease	1	Phosphate	Μεταβολισμός Φωσφονικών Οξέων και Παραγώγων

169 - 10 vs wt



Εικόνα 3.16 Επίδραση του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{P_{sph}}* στα βιοσυνθετικά μονοπάτια της σειράς 161-80. Στις στήλες δηλώνονται οι μεταβολικοί οδοί, οι μεταβολίτες των οποίων παρουσιάζουν αυξημένη συσσώρευση (κόκκινο), μειωμένη συσσώρευση (πράσινο), απουσία μεταβολής (κίτρινο), σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου (wt) και το σύνολο αυτών (γκρι). Η κατηγοριοποίηση των μεταβολιτών στις αντίστοιχες μεταβολικές οδούς έγινε βάσει των κωδικών που χρησιμοποιούνται στη βάση δεδομένων KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

Πίνακας 3.5 Κατηγοριοποίηση μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στη *SP/hrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακή σειρά 169-10, βάσει της συμμετοχής τους σε βιοσυνθετικά μονοπάτια.

Βιοσυνθετικό Μονοπάτι	Σειρά 169 - 10	Μεταβολίτες	Λειτουργία
map01230Biosynthesis of amino acids	2	L-Threonine, L-Proline	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map02020Two-componentsystem	1	Phosphate	Μεταβολισμός φωσφορικών οξέων και παραγώγων
map00010Glycolysis / Gluconeogenesis	1	b-Lactate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00030Pentose phosphate pathway	5	Deoxyribose, 2-Keto-D-gluconic acid, Glyceric acid, D-Ribose, Gluconolactone	Μεταβολισμός Υδατανθράκων, Μεταβολισμός Καρβοξυλικών οξέων, Μεταβολισμός Οξέων Ζαχαρών
map00040Pentose and glucuronate interconversions	3	Glycerol, Xylose, Xylitol	Μεταβολισμός Υδατανθράκων & παραγώγων Υδατανθράκων & Μονοζαχαριτών & Αλκοολών Ζαχαρών
map00051Fructose and mannose metabolism	3	b-Lactate, D-Fructose, Sorbitol	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Υδατανθράκων & παραγώγων & Αλκοολών Ζαχαρών
map00052Galactose metabolism	5	Glycerol, D-Fructose, Sorbitol, Melibiose, D-Galactose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων & παραγώγων & Αλκοολών Ζαχαρών
map00053Ascorbate and aldarate metabolism	1	Threonic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων
map00061Fatty acid biosynthesis	3	Stearic acid, Octanoic acid,	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων

Myristic acid			
map00190Oxidative phosphorylation	1	Phosphate	Μεταβολισμός φωσφονικών οξέων και παραγώγων
map00195Photosynthesis	1	Phosphate	Μεταβολισμός φωσφονικών οξέων και παραγώγων
map00230Purine metabolism	2	Adenosine, Cadaverine	Μεταβολισμός Νουκλεϊκών Οξέων & Πουρινών & Μεταβολισμός Πολυαμινών & Δυναμινών
map00240Pyrimidine metabolism	2	Malonic acid, Carbamic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00250Alanine, aspartate and glutamate metabolism	1	GABA	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00260Glycine, serine and threonine metabolism	2	Glyceric acid, L-Threonine	Μεταβολισμός Αμινοξέων & Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00261Monobactam biosynthesis	1	L-Threonine	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00270Cysteine and methionine metabolism	1	2-Ethylhexyl hexyl sulfite	Μεταβολισμών Ανόργανων Οξέων & Σουλφιδικών Οξέων
map00290Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	1	L-Threonine	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00330Arginine and proline metabolism	2	GABA, L-Proline	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map00350Tyrosine metabolism	1	Maleic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00410beta-Alanine metabolism	2	Malonic acid, GABA	Μεταβολισμός Αμινοξέων & Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00430Taurine and hypotaurine metabolism	1	2-Ethylhexyl hexyl sulfite	Μεταβολισμών Ανόργανων Οξέων & Σουλφιδικών Οξέων
map00480Glutathione metabolism	1	Cadaverine	Μεταβολισμός Πολυαμινών & Δυναμινών
map00500Starch and sucrose metabolism	2	D-Fructose, a,a-Trehalose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων & παραγώγων Υδατανθράκων & Διζαχαριτών
map00520Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	1	Xylose	
map00561Glycerolipid metabolism	3	Glyceric acid, Glycerol, Glycerol-3-phosphate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Υδατανθράκων & παραγώγων Υδατανθράκων
map00562Inositol phosphate metabolism	1	D-Myo-inositol-5-phosphate	Μεταβολισμός Υδατανθράκων & Παραγωγή φωσφορικών Οξέων
map00564Glycerophospholipid metabolism	2	Glycerol-3-phosphate, Ethanolamine	Μεταβολισμός Υδατανθράκων
map00592alpha-Linolenic acid metabolism	1	a-Linolenic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων
map00620Pyruvate metabolism	1	b-Lactate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00630Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	2	Glyceric acid, Tartaric acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Υδατανθράκων & παραγώγων
map00640Propanoate metabolism	1	b-Lactate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00643Styrene degradation	1	b-Lactate	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00650Butanoate metabolism	3	GABA, Maleic acid, Butyric acid	Μεταβολισμός Αμινοξέων & Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00680Methane metabolism	1	Glyceric acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00710Carbon fixation in photosynthetic organisms	1	Sedoheptulose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων
map00760Nicotinate and nicotinamide metabolism	2	GABA, Maleic acid	Μεταβολισμός Αμινοξέων & Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00910Nitrogen metabolism	1	Carbamic acid	Μεταβολισμός Υδατανθράκων
map00920Sulfur metabolism	1	2-Ethylhexyl hexyl sulfite	Μεταβολισμών Ανόργανων Οξέων & Σουλφιδικών Οξέων
map00930Caprolactam degradation	1	Adipic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων
map00940Phenylpropanoid biosynthesis	1	Caffeic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Φαινυλοπροπανολών
map00960Tropine	1	Cadaverine	Μεταβολισμός Πολυαμινών & Δυναμινών
map00970Aminoacyl-tRNA biosynthesis	2	L-Threonine, L-Proline	Μεταβολισμός Αμινοξέων
map01040Biosynthesis of unsaturated fatty acids	3	Stearic acid, a-Linolenic acid, Arachidic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων
map01060Biosynthesis of plant secondary metabolites	3	Stearic acid, Octanoic acid, a-Linolenic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων
map01061Biosynthesis of phenylpropanoids	3	Caffeic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Φαινυλοπροπανολών
map01064Biosynthesis of alkaloids derived from ornithine, lysine and nicotinic acid	1	Cadaverine	Μεταβολισμός Πολυαμινών & Δυναμινών

map01066Biosynthesis of alkaloids derived from terpenoid and polyketide	1	Octanoic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων
map01070Biosynthesis of plant hormones	1	a-Linolenic acid	Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων
map01100Metabolic pathways	12	b-Lactate, Xylose, Xylitol, Sorbitol, D-Galactose, Myristic acid, Phosphate, 2-Ethylhexyl hexyl sulfite, Glycerol-3-phosphate, D-Myo-inositol-5-phosphate, Ethanolamine, Caffeic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Υδατανθράκων & παραγώγων & Παράγωγα φωσφορικών Οξέων & Μονοζαχαριτών & Μεταβολισμός Λιπαρών Οξέων & Μεταβολισμός παραγώγων φωσφορικών οξέων & παραγώγων & Μεταβολισμών Ανόργανων Οξέων & Σουλφιδικών Οξέων & Φαινυλοπροπανολών & Μεταβολισμός αμινών
map01110Biosynthesis of secondary metabolites, Caffeic acid	5	b-Lactate, Glyceric acid, Gluconolactone, Glycerol-3-phosphate, Caffeic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Φαινυλοπροπανολών & Μεταβολισμός Υδατανθράκων
map01120Microbial metabolism in diverse environments	4	Gluconolactone, D-Fructose, 2-Ethylhexyl hexyl sulfite, Maleic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Μεταβολισμός Υδατανθράκων & Μεταβολισμών Ανόργανων Οξέων & Σουλφιδικών Οξέων
map01130Biosynthesis of antibiotics	1	Gluconolactone	Μεταβολισμός Υδατανθράκων
map01200Carbon metabolism	1	Gluconolactone	Μεταβολισμός Υδατανθράκων
map01220Degradation of aromatic compounds	1	Caffeic acid	Μεταβολισμός Καρβοξυλικών Οξέων & Φαινυλοπροπανολών
map02010ABC transporters	13	D-Ribose, Glycerol, Xylose, Xylitol, D-Fructose, Sorbitol, Melibiose, Phosphate, L-Threonine, L-Proline, a,a-Trehalose, Glycerol-3-phosphate, Erythritol	Μεταβολισμός Υδατανθράκων & παραγώγων & Μονοζαχαριτών & Μεταβολισμός φωσφονικών οξέων και παραγώγων & Μεταβολισμός Αμινοξέων & Μεταβολισμός Υδατανθράκων & διζαχαριτών & Μεταβολισμός Υδατανθράκων & παραγώγων & Παράγωγα φωσφορικών Οξέων
map02024Quorum sensing	1	Phosphate	Μεταβολισμός φωσφονικών οξέων και παραγώγων
map02030Bacterial chemotaxis	1	D-Galactose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων
map02060Phosphotransferase system (PTS)	3	Sorbitol, D-Galactose, a,a-Trehalose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων & διζαχαριτών
map04070Phosphatidylinositol signaling system	1	D-Myo-inositol-5-phosphate	Μεταβολισμός Υδατανθράκων & Παράγωγα φωσφορικών Οξέων
map04111Cellcycle-yeast map	1	Phosphate	Μεταβολισμός φωσφονικών οξέων και παραγώγων
map04973Carbohydrate digestion and absorption	1	D-Galactose	Μεταβολισμός Υδατανθράκων
map04978Mineral absorption	2	D-Galactose, Phosphate	Μεταβολισμός Υδατανθράκων & Μεταβολισμός φωσφονικών οξέων και παραγώγων
map05012Parkinson's disease	1	Phosphate	Μεταβολισμός φωσφονικών οξέων και παραγώγων
map05231Choline metabolism in cancer		Glycerol-3-phosphate	Μεταβολισμός Υδατανθράκων & παραγώγων & Παράγωγα φωσφορικών Οξέων

4. Συζήτηση

Η ανακάλυψη ότι οι χαρπίνες, κατά την εξωγενή ή ενδογενή έκφρασή τους, ενεργοποιούν την άμυνα των φυτών, συχνά μέσω της επαγωγής της αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) οδήγησε στην αξιοποίησή τους ως φυτοπροστατευτικές ουσίες έναντι βακτηρίων, μυκήτων, ιών, (Strobel et al., 1996; Dong et al., 1999; Li and Fan, 1999; Peng et al., 2003; 2004; Takamura et al., 2004; Ren et al., 2006a; 2006b; Shao et al., 2008; Wang et al., 2008; Pavli et al., 2011), εντόμων (Dong et al., 2004), αλλά και αβιοτικών καταπονήσεων (Dong et al., 2005; Zhang et al., 2007; 2011).

Προς την κατεύθυνση αυτή, προηγούμενες μελέτες υπογραμμίζουν τη δυνατότητα της χαρπίνης HrpZ_{P_{sph}}, από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, να επιτυγχάνει υψηλή ανθεκτικότητα έναντι του ιού *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) που προκαλεί την ασθένεια της ριζομανίας των ζαχαροτεύτλων (Pavli et al., 2011; 2012). Πιο συγκεκριμένα, το διαγονίδιο SP/hrpZ_{P_{sph}} που κωδικοποιεί την εκκρινόμενη μορφή της χαρπίνης, μέσω της ένθεσης του τμήματος του N-αμινοτελικού άκρου του πεπτιδίου της πρωτεΐνης παθογένειας PR1 του καπνού (Tampakaki and Panopoulos, 2000; Pavli et al., 2011), αποδείχθηκε ότι προσδίδει ανθεκτικότητα στη ριζομανία σε διαγονιδιακά φυτά του είδους-μοντέλου *Nicotiana benthamiana* καθώς και σε διαγονιδιακές ρίζες ζαχαρότευτλου. Παράλληλα, πρόσφατες έρευνες υποδεικνύουν ότι η έκφραση της SP/HrpZ_{P_{sph}} σε φυτά *N. benthamiana* συνδέεται με καθυστερημένη και ηπιότερη ανάπτυξη συμπτωμάτων έπειτα από μόλυνση με τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (TMV) και το βακτήριο *P. syringae* pv. tomato (Μητσοπούλου, 2016). Είναι ωστόσο αξιοσημείωτο ότι, πέραν της επίτευξης ανθεκτικότητας, αναφέρεται η επίδραση της SP/HrpZ_{P_{sph}} σε αναπτυξιακό επίπεδο, προκαλώντας προηγμένη ανάπτυξη και ευρωστία (Pavli et al., 2011; 2012).

Στο πλαίσιο των ανωτέρω, στόχο της μεταπτυχιακής διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης του διαγονιδίου SP/hrpZ_{P_{sph}} ως προς την βασική άμυνα και το μεταβολισμό διαγονιδιακών φυτών του είδους *N. benthamiana*. Έπειτα από έλεγχο των διαθέσιμων διαγονιδιακών σειρών (T₂) για την ομοζύγωτη/ετεροζύγωτη κατάσταση του SP/hrpZ_{P_{sph}}, οι επιλεγμένες ομοζύγωτες σειρές αποτέλεσαν το γενετικό υλικό για τα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας και της μεταβολομικής.

Σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές (Pavli et al., 2011; 2012), τα SP/HrpZ_{P_{sph}}-διαγονιδιακά φυτά παρουσίασαν φυσιολογικό φαινότυπο και απουσία νέκρωσης ή άλλου

τύπου συμπτωματολογία, ωστόσο εμφάνισαν σαφώς αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης και ευρωστία, συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου, σε όλα τα στάδια ανάπτυξής τους. Ανάλογα ευρήματα προηγμένης ανάπτυξης, έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία και για προερχόμενες από άλλα βακτήρια χαρπίνες. Στο πλαίσιο αυτό έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση τους σε διαγονιδιακά φυτά (Jang et al., 2006; Ren et al., 2006b; Huo et al., 2010) καθώς και η εξωγενής εφαρμογή τους (Dong et al., 2004; Ren et al., 2006a, Wu et al., 2007; Chen et al., 2008) οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης, η οποία πιθανώς συνδέεται με αποτελεσματικότερη απορρόφηση θρεπτικών στοιχείων και αύξηση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας (Kim and Beer, 2000; Jang et al., 2006; Oh and Beer, 2007) (Jang et al., 2006).

Με στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{P_{sph}}* στην ανθεκτικότητα των φυτών έναντι καταπονήσεων, πραγματοποιήθηκαν τεχνητές μολύνσεις, μέσω αιωρήματος κυττάρων, με το βακτήριο *P. syringae* pv. *tomato* (στέλεχος DC3000) και ακολούθησε η συγκριτική αξιολόγησή τους με φυτά αγρίου τύπου. Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έγινε βάσει φαινοτύπου και εκτίμησης της αποίκησης του βακτηρίου. Τα αποτελέσματα υπογραμμίζουν την ύπαρξη σημαντικών διαφορών, μεταξύ των διαγονιδιακών και των φυτών αγρίου τύπου, οι οποίες εκφράζονται με ηπιότερη και καθυστερημένη ανάπτυξη των συμπτωμάτων της ασθένειας αλλά και με τη μειωμένη αποίκηση του βακτηρίου στα διαγονιδιακά φυτά. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις τα διαγονιδιακά φυτά εμφάνισαν νεκρωτικές κηλίδες στο μέσο του ελάσματος των φύλλων. Παρόμοια συμπτωματολογία έχει αναφερθεί σε *SP/HrpZ_{P_{sph}}*-διαγονιδιακά φυτά τα οποία εμφάνισαν υψηλό επίπεδο ανθεκτικότητας έπειτα από τεχνητή μόλυνση με τον ιό BNYVV (Pavli et al., 2011). Τα συμπτώματα αυτά πιθανολογείται ότι σηματοδοτούν την επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας, η οποία εικάζεται ότι οφείλεται στην εξωκυτταρική έκφραση της *SP/HrpZ_{P_{sph}}* που με τη σειρά της οδηγεί σε μία κατάσταση "προηγμένης γενικής άμυνας" ("primed state"). Ενναλακτικά, η πρόκληση της HR μπορεί να αποδοθεί σε μία σειρά από διαδοχικές μοριακές αντιδράσεις που έπονται της μόλυνσης φυτών καπνού με το βακτήριο Pst DC3000 και συγκεκριμένα αφορούν στην επαγωγή γονιδίων στο βιοχημικό μονοπάτι βιοσύνθεσης σαλικυλικού οξέος, υπερσυσσώρευση SA, η οποία τελικά αποτελεί το έναυσμα για την ενεργοποίηση της HR (Liu et al., 2013). Συμπερασματικά, τα ευρήματα αυτά παρέχουν ενδείξεις ότι η *SP/HrpZ_{P_{sph}}* οδηγεί σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης και ότι η παρατηρηθείσα ανθεκτικότητα πιθανώς σχετίζεται με πρόκληση της HR. Επιπλέον, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η έκφραση της *SP/HrpZ_{P_{sph}}*

μπορεί να αξιοποιηθεί ως μία προσέγγιση για την επίτευξη ευρείας ανθεκτικότητας και ταυτόχρονα ενισχύουν την άποψη ότι οι χαρπίνες συνιστούν μία κατηγορία πρωτεϊνών που μπορεί να παίζουν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας, μέσω της χρήσης γενετικής μηχανικής (Shao et al., 2008).

Στοχεύοντας στη μελέτη της επίδρασης του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{P_{sph}}* στο μεταβολισμό του είδους *N. benthamiana* αξιοποιήθηκε η μεταβολομική (metabolomics), η οποία λειτουργεί ως συνδετικός κρίκος μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου δίνοντας πρόσβαση στο τελευταίο στάδιο ροής της βιολογικής πληροφορίας από τη γονιδιακή έκφραση στο μεταβολικό φαινότυπο. Στο πλαίσιο της μεταβολομικής, έγινε εκχύλιση των μεταβολιτών, ακολούθησε ανάλυση σε πλατφόρμα αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με ανιχνευτή μάζας και σε τελικό στάδιο έγινε επεξεργασία των μεταβολικών προφίλ προκειμένου να ανακαλυφθούν οι τάσεις στα δεδομένα και να προσδιοριστούν οι σημαντικοί βιοδείκτες. Η ανάλυση του μεταβολικού προφίλ επέτρεψε την ανίχνευση ενός μεγάλου αριθμού μεταβολιτών, εκ των οποίων σημαντικό μέρος ταυτοποιήθηκε και ανήκε στις χημικές ομάδες των υδατανθράκων, αμινοξέων, αλκοολών, αμινών, καρβοξυλικών οξέων, λιπαρών οξέων, ανόργανων οξέων, νουκλεϊκών οξέων, παράγωγων φωσφορικού οξέος, πολυαμινών, γλυκερολιπιδίων και υδρογονανθράκων.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι οι βιολογικές επαναλήψεις των διαγονιδιακών σειρών διαφέρουν με τα wt φυτά, επιβεβαιώνοντας τη σημαντική επίδραση του *hrpZ_{P_{sph}}* στο μεταβολισμό του φυτού. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις, παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των διαφορετικών *hrpZ_{P_{sph}}*-σειρών, γεγονός που οφείλεται στο ότι οι T₂ σειρές συνιστούν απογόνους αυτογονιμοποίησης διαφορετικών συμβάντων μετασχηματισμού. Οι παρατηρηθείσες διαφορές στο μεταβολικό προφίλ βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών που αναφέρουν τις διαφορές των σειρών τόσο σε επίπεδο παραγόμενων *hrpZ_{P_{sph}}* - μεταγραφημάτων όσο και σε επίπεδο ανθεκτικότητας (Pavli et al., 2011; Pavli et al., unpublished data). Ωστόσο, στην περίπτωση των σειρών 161 και 167, που συνιστούν διαφορετικά συμβάντα γενετικού μετασχηματισμού, το μεταβολικό προφίλ κατέδειξε τη μεταξύ τους ομοιότητα και τη διαφοροποίησή τους σε σχέση με τις υπόλοιπες διαγονιδιακές σειρές καθώς και τα wt φυτά.

Στο σύνολό τους, τα ευρήματα αυτά καθιστούν ξεκάθαρη την επίδραση του *hrpZ_{P_{sph}}* στο μεταβολισμό των φυτών *N. benthamiana*. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα παρέχουν σημαντικές ενδείξεις σχετικά με τη δυνατότητα της μεταβολομικής ανάλυσης να ανιχνεύσει

αλλαγές στο μεταβολικό προφίλ οι οποίες σηματοδοτούν τα μεταβολικά δίκτυα στα οποία εμπλέκονται.

Η ανακάλυψη των μεταβολιτών-βιοδεικτών της επίδρασης του *SP/hrpZ_{P_{sph}}* στο μεταβολισμό του *N. benthamiana* έγινε μέσω της σύγκρισης μεταξύ των μεταβολικών προφίλ των διαγονιδιακών και wt φυτών. Ο προσδιορισμός των βιοδεικτών έγινε χρησιμοποιώντας ως διακύμανση για τους μεταβολίτες τιμή Coefficient >2,5 και <-2,5. Σημειώνεται ότι οι απόλυτες τιμές είναι ανάλογες τις βαρύτητας των αντίστοιχων μεταβολιτών στον παρατηρούμενο διαχωρισμό (Aliferis et al., 2014).

Στην ομάδα των υδατανθράκων σημαντική αύξηση καταγράφηκε για την τρεχαλόζη (α,α-Trehalose) στο σύνολο σχεδόν των σειρών που εξετάστηκαν (161-80, 166-19, 169-10 και 160-12). Στην τρεχαλόζη αποδίδεται πολυδιάστατος ρόλος στο μεταβολισμό των φυτών καθώς εμπλέκεται σε διεργασίες όπως η μεταγωγή σήματος σε αλληλεπιδράσεις με φυτοπαθογόνους ή συμβιώτες οργανισμούς και έντομα, η άμυνα των φυτών και αντοχή των κυτταρικών μεμβρανών υπό συνθήκες καταπόνησης, η ρύθμιση της αγωγιμότητας των στομάτων και η αποτελεσματικότητα της χρήσης νερού (Lunn et al., 2014; Aliferis and Jabaji, 2010; Grennan, 2007; Elbein et al., 2003). Στα φυτά, όπως και σε άλλους ευκαρυωτικούς αλλά και αρκετούς προκαρυωτικούς οργανισμούς η τρεχαλόζη συντίθεται από τη συνθάση της 6-φωσφο-τρεχαλόζης (trehalose 6-phosphate, Tre6P), της οποίας τα επίπεδα μεταβάλλονται παράλληλα με αυτά της σουκρόζης που συνιστά το κύριο προϊόν της φωτοσύνθεσης (Lunn et al., 2014). Σε ορισμένες από τις σειρές που εξετάστηκαν, αυξημένη συσσώρευση εμφάνισαν επίσης τα ζάχαρα μελιβιόζη (Melibiose) (166-19 και 169-10) και σεδοεπτουλόζη (Sedoheptulose) (166-19 και 161-80). Αντίθετα, η συσσώρευση των υδατανθράκων γλυκόζη (D-Glucose) και φρουκτόζη (D-Fructose) ήταν μειωμένη στο σύνολο σχεδόν των σειρών που εξετάστηκαν.

Σημαντική επίσης υπερσυσσώρευση σημειώθηκε στο μεταβολίτη μυο-ινοσιτόλη (Myo-inositol) στις σειρές 160-12, 161-80 και 167-8, ενώ αντίθετα μειώθηκε στις σειρές 166-19 και 169-10. Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης σχετίζεται με πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών όπως η μεταφορά σημάτων (signaling transduction), ο σχηματισμός μεμβρανών η σύνθεση κυτταρικών τοιχωμάτων, η άμυνα σε καταπονήσεις, η αποθήκευση φωσφορικού οξέος και η αποθήκευση και μεταφορά ρυθμιστών αύξησης (Loewus and Murthy, 2000; Majee et al., 2004; Shiozaki et al., 2005). Παράλληλα, αναφέρεται ότι το βιοσυνθετικό μονοπάτι της ινοσιτόλης συνιστά την κύρια οδό μεταβολισμού του άνθρακα κατά τα αρχικά στάδια της προσαρμογής σε αβιοτικές καταπονήσεις (Bohnert and Sheveleva, 1998). Στην

ομάδα των πολυολών, σημαντική αύξηση επίσης καταγράφηκε στη γλυκερόλη (Glycerol) (160-12, 161-80 και 167-8). Η υπερσυσσώρευση πολυολών συνδέεται με την ωσμορύθμιση σε φυτά που υπόκεινται σε καταπονήσεις καθώς και στη διατήρηση των μεταβολικών διεργασιών υπό συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης (Guo and Oosterhuis, 1995; Patonnier et al., 1999; Rizhsky et al., 2004).

Στην ομάδα των αμινοξέων, σημαντική αύξηση καταγράφηκε σε ένα μεγάλο αριθμό συστατικών, συμπεριλαμβανομένου της προλίνης (L-Proline) στις σειρές 160-12, 161-80, 166-19, 169-10, στην οποία αποδίδεται ρόλος σε ποικίλες μεταβολικές διεργασίες, με κεντρική αυτή της ωσμοπροστατευτικής και ωσμορυθμιστικής δράση. Στο πλαίσιο αυτό, πληθώρα μελετών αναφέρουν τη θετική συσχέτιση μεταξύ προλίνης και καταπονήσεων και υπογραμμίζουν το γεγονός ότι η προλίνη παίζει σημαντικότατο ρόλο στην άμυνα των φυτών που εκτίθενται σε καταπονήσεις. Πέραν της δράσης της ως ωσμολύτη, οι λειτουργίες της κατά την έκθεση των φυτών σε στρες αφορούν αντιοξειδωτική προστασία και μεταγωγή σημάτων στρες (Hayat et al., 2012). Γενικά, τα αμινοξέα αποτελούν δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών και συμμετέχουν στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών (Bayram et al., 2016) καθώς και στην ανάπτυξη του οργανισμού (Kim and Kim, 2017). Επίσης, στις διαγονιδιακές σειρές 160-12, 161-80 και 169-10 σημειώθηκε αυξημένη σχετική περιεκτικότητα του αμινοξέος GABA (γ-Aminobutyric acid), το οποίο συνδέεται με ποικίλες μεταβολικές διεργασίες. Αντίθετα, στις σειρές 167-8 και 166-19, καταγράφηκε σημαντική μείωση του GABA. Πέραν της εμπλοκής του στην απόκριση των φυτών έναντι καταπονήσεων, συμπεριλαμβανομένου της ξηρασίας, υψηλής θερμοκρασίας και προσβολής από έντομα, έρευνες στο φυτό-μοντέλο *A. thaliana* καταδεικνύουν το ρόλο του GABA ως σηματοδοτικού μορίου και τον ενεργό του ρόλο στο μεταβολισμό άνθρακα:αζώτου (Bouché and Fromm, 2004; Li and Yu, 2016). Πρόσφατα ωστόσο έχει διατυπωθεί ότι είναι άγνωστο εάν η συσσώρευση του GABA αντιπροσωπεύει τη ρύθμιση του μεταβολισμού υπό συνθήκες καταπόνησης ή μία αντίδραση προσαρμογής η οποία μιμείται συνθήκες καταπόνησης (Bown and Shelp 2016).

Στην ομάδα των αμινών, καταγράφηκε σημαντική αύξηση του μεταβολίτη αιθανολαμίνη (ethanolamine) στις σειρές 166-19 που έχει κεντρικό ρόλο στη βιοσύνθεση μεμβρανών/φωσfolιπιδίων (Meyer et al., 2007). Στις σειρές 160-12 και 161-80, σημαντική αύξηση επίσης σημειώθηκε στο φωσφορικό οξύ (phosphate), που εμφανίζει πολυδιάστατο ρόλο στο μεταβολισμό των φυτών και, μεταξύ άλλων, εμπλέκεται στη μεταφορά σημάτων (signal transduction) (Ding et al., 2009).

Στην ομάδα των πολυαμινών, σημαντική αύξηση καταγράφηκε για την καδαβερίνη στις σειρές 166-19, 169-10 και 167-8. Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης είναι μία διαμίνη που παράγεται ως καταβολίτης της λυσίνης και εμπλέκεται στην αύξηση και ανάπτυξη των φυτών, σε συνάρτηση με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Ο καταβολισμός της λυσίνης καταλύεται από την δεκαρβοξυλάση της λυσίνης που υπόκειται στη ρύθμιση της ανάπτυξης (Tomar et al., 2013). Αναφορικά με το ρόλο της στην άμυνα των φυτών, έχει αναφερθεί ότι οι διαμίνες πουτρεσκίνη και καδαβερίνη, καθώς και οι πολυαμίνες σπερμιδίνη και σπερμίνη, πιθανώς εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την άμυνα έναντι περιβαλλοντικών στρες (Galston et al., 1997; Tassoni et al., 1998). Μελέτες αναφέρουν ότι σε ανθεκτικά είδη, τα χαμηλά επίπεδα πουτρεσκίνης εξομειώνονται από τις καδαβερίνη και σπερμιδίνη. Παρά την υπερσυσσώρευσή της σε ορισμένα είδη, ο ρόλος της καδαβερίνης στην άμυνα των φυτών δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως αν και έχει προταθεί ότι η αναστολή της βιοσύνθεσης πουτρεσκίνης ενεργοποιεί τη μετατροπή της βιοσύνθεσης λυσίνης σε αυτή της καδαβερίνης (Bouchereau et al., 1999), ως μέσο εξισορρόπησης των πολυαμινών.

Στο σύνολό τους, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης υπογραμμίζουν το γεγονός ότι η έκφραση του γονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* επιδρά σημαντικά στο μεταβολισμό των φυτών και επιπρόσθετα, αποτελεί μία υποσχόμενη στρατηγική για την ανάπτυξη ευρείας ανθεκτικότητας σε διαγονιδιακά φυτά. Δεδομένου ότι η επίτευξη αυτού του στόχου προϋποθέτει την εις βάθος κατανόηση των μεταβολών που συνδέονται με την έκφραση του *hrpZ_{P_{sph}}* σε πρωτεϊνικό και μεταγραφικό επίπεδο, είναι προφανές ότι απαιτείται περαιτέρω αξιολόγηση των *hrpZ_{P_{sph}}*-φυτών αξιοποιώντας προσεγγίσεις βιολογίας συστημάτων.

5. Βιβλιογραφία

Βιβλιογραφία

Ελληνική βιβλιογραφία

- Αθανασούλη Β. (2009). *Έκφραση χαρπινών στα φυτά σε σχέση με την ανθεκτικότητα σε βιοτικές καταπονήσεις* (Μεταπτυχιακή Διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2009).
- Βακαλουνάκης Δ. και Φραγκιαδάκης Γ. (2003). *Φυτοπαθοβελτίωση με έμφαση στην τομάτα και τα κολοκυνθοειδή*. Βακαλουνάκης, Ηράκλειο, 518 σελ. (ISBN: 960-92150-0-9).
- Ζιώγας, Β. και Μαρκόγλου, Α. (2010). Γεωργική Φαρμακολογία. Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων. 2η έκδοση, Εκδόσεις Ζιώγας-Μαρκόγλου, Αθήνα. (σελ. 737, 739, 740,).
- Καραταγλής Σ. (1999). Φυσιολογία Φυτών. 3η έκδοση MI OY Text, Θεσσαλονίκη.
- Λαζαρίδη Ε. (2012), Μελέτη της διαγονιδιακής έκφρασης χαρπίνης HrZpsph σε Φυτά *Nicotiana Benthamiana* κάτω από συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων (Μεταπτυχιακό, ΓΠΑ, 2012).
- Μανέτας, Ι. (2005). Φυσιολογία Φυτών. Εκδόσεις Ίων. Αθήνα. (σελ. 150, 249).
- Μητσοπούλου Ν. (2016). *Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας σε παθογόνους μικροοργανισμούς σε φυτά N. benthamiana που εκφράζουν ενδογενώς τη χαρπίνη HrpZPsph*. (Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2016).
- Πασπάτης Ε.Α. (1998). Φυτορυθμιστικές ουσίες. Εκδόσεις Αγρότυπος, Αθήνα.
- Ταμπακάκη, Α.Π. (1999). Μοριακή και Βιοχημική Μελέτη Πρωτεϊνών του Εκκριτικού Συστήματος Τύπου III στο Φυτοπαθογόνο Βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* και Διερεύνηση του Ρόλου τους στην Αντίδραση Υπερευαισθησίας των Φυτών. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας, Ηράκλειο. (σελ. 19, 55)
- Τζάμος, Ε. Κ. (2007). Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Α. Σταμούλη, Β' Έκδοση, Αθήνα. (σελ. 383-385, 395, 398, 404, 405, 406, 415-416).

Ξένη βιβλιογραφία

- Abeles F. 13., P. W. Morgan, and M. E. Saltveit Jr (1992). Ethylene in plant biology, 2nd ed. Academic Press, San Diego, Calif
- Aftab T., Masroor M., Khan A., Idrees M., and Naeem M. (2010) Salicylic Acid acts as Potent Enhancer of Growth, Photosynthesis and Artemisinin Production in *Artemisia annua* L. *J.Crop Science Biotechnology*, 13 (3), p. 183 – 188. DOI: 10.1007/s12892-010-0040-3
- Agrawal, A. A., Tuzun, S. & Bent, E. (1999). Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores: Biochemistry, Ecology, and Agriculture (Am. Phytopathological Soc., St. Paul).
- Agrios, G.N. (2005). Plant Pathology Fifth Edition. *Elsevier Academic Press USA* p.p. 237 – 242, 315 – 316.
- Alfano, J.R. and Collmer, A. (1997). The Type III (Hrp) Secretion Pathway of Plant Pathogenic Bacteria: Trafficking Harpins, Avr Proteins, and Death. *J Bacteriol.* 179, 18, 56, 55-62.
- Aliferis K. and Chrysai-Tokousbalides M. (2011). Metabolomics in pesticide research and development: review and future perspectives. *Metabolomics*, 7, 35-53.
- Aliferis K. and Jabaji S. (2010). ¹H NMR and GC-MS metabolic fingerprinting of developmental stages of *Rhizoctonia solani* sclerotia. *Metabolomics*, 6, 96-108.
- Aliferis K. and Jabaji S. (2011). Metabolomics – A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: A review. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 100(2):105-117. DOI: 10.1016/j.pestbp.2011.03.004
- Aliferis K., Faubert D. & Jabaji S. (2014). A metabolic profiling strategy for the dissection of plant defense against fungal pathogens. *PloS one*, 9, e111930.
- Arberg, B. (1981) Plant Growth Regulators XLI. Mono Substituted Benzoic Acid. *Swedish Journal of Agricultural Research*, 11, 93-105.
- Baldwin D, Rees G, Mitchell A and Kerr J. (2006). The short-term effect of salinization on anaerobic nutrient cycling and microbial community structure in sediment from a freshwater wetland. *Wetlands*, 26 (2): 455-464. DOI: 10.1672/0277-5212(2006)26[455:TSEOSO]2.0.CO;2.

- Ballhorn, D.J., Kautz, S., Heil, M. & Hegeman, A.D. (2009) Cyanogenesis of wild lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is an efficient direct defence in nature. *Plos one*, 4, e5450.
- Bari R and Jones JDG (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* 69: 473-488.
- Basra S, Amarjit (2001). Crop Responses and Adaptations to Temperature Stress, PhD Food Products Press
- Bayram Ö., Feussner K., Dumkow M., Herrfurth C., Feussner I. and Braus H. (2016). Changes of global gene expression and secondary metabolite accumulation during lightdependent *Aspergillus nidulans* development. *Fungal Genetics and Biology*, 87, 30-53.
- Belhadj A, Telef N, Cluzet S, Bouscaut J, Corio-Costet MF, Merllion JM (2008). Ethephon elicits protection against *Erysiphe necator* in grapevine. *J Agric Food Chem* 56: 5781-5787.
- Bogdanove, A. J., Beer, S. V., Bonas, U., Boucher, C. A., Collmer, A., Coplin, D. L., Cornelis, G. R., Huang, H. C., Hutcheson, S. W., Panopoulos, N. J., and Van Gijsegem, F. (1996). Unified nomenclature for broadly conserved hrp genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* 20, 3, 681-683.
- Boller T. (1991) Ethylene in pathogenesis and disease resistance, p. 293-324. In A. K. Mattoo and J. C. Smiley (ed.), *The plant hormone ethylene*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Bouché N. and Fromm H. (2004). *GABA in plants: just a metabolite?*. Volume 9, 3, p.110-115, DOI: doi.org/10.1016/j.tplants.2004.01.006
- Büttner, D. and He, S.Y. (2009). Update on Bacterial Type III Secretion, Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria. *Plant Physiology* 150, 4, 1656–1664.
- Boucher, C., Z. Altamimi, and P. Sillard, *Results and analysis of the ITRF96, in IERS Technical Note* 24, pp. 3–15, Observatoire de Paris, 1998.
- Boucher C, Martinel A, Barberis P, Alloing G and Zischek C (1986). Virulence genes are carried by a megaplasmid of the plant pathogen *Pseudomonas solanacearum* *Mol. Gen. Genet.* 205: 270.
- Bouchereau A., Aziz A. and Martin-Tanguy J. (1999) *Polyamines and environmental challenges: recent development*. Volume 140, 2, Pages 103-125, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00218-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00218-0)

- Bown A. and Shelp B. (2016). *Plant GABA: Not Just a Metabolite*. 21, p. 811-813. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.001>.
- Brooker R. and Kikvidze Z. (2008). Importance: an overlooked concept in plant interaction research. 96, *Journal of Ecology*, p.703-708. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2008.01373.x.
- Büttner D. and He S. (2009) Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria. *Plant Physiol.* 150 (4): 1656-1664. doi: 10.1104/pp.109.139089.
- Chapman S., Culhane K.,[†]Harward H., [‡]Mendelsohn D., [§]Ewing-Cobbs L., ^{||}Fletcher J., ^{||}Bruce D., (1992). *Narrative discourse after closed head injury in children and adolescents*. Volume 43, 1, p. 42-65, DOI: [https://doi.org/10.1016/0093-934X\(92\)90020-F](https://doi.org/10.1016/0093-934X(92)90020-F).
- Chincholkar S and Thomashow LS (2014). *Microbial Phenazines*. Springer Berlin, Heidelberg, German, p.199-216.
- Cho C, Reck-Peterson SL and Vale RD (2008) Regulatory ATPase sites of cytoplasmic dynein affect processivity and force generation. *J Biol Chem* 283(38):25839-45.
- Cohn JR, Martin GB (2005). *Pseudomonas syringae* pv. tomato type III effectors AvrPto and AvrPtoB promote ethylene-dependent cell death in tomato. *Plant Journal* 44,139-154.
- Chen L, Qian J, Qu SP, Long JY, Yin Q, Zhang CL, Wu XJ, Sun F, Wu TQ, Beer SV, Dong HS (2008a). Identification of specific fragments of HpaGXooc, a harpin from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, that induce disease resistance and enhance growth in plants. *Phytopathology* 98(7):781-791
- Chen L, Zhang SS, Qu SP, Long JY, Yin Q, Qian J, Sun F, Zhang SJ, Zhang CL, Wang LX, Wu XJ, Wu TQ, Zhang ZK, Cheng ZQ, Beer SV, Dong HS (2008b). A fragment of the *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* harpin HpaGXooc reduces disease and increases yield of rice in extensive grower plantings. *Plant Mol Biol Rep* 26:225–240
- Collard, B. C. Y. & Mackill D. J. (2008). Marker – assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty – first century. *The Royal Society*, 363. DOI: <http://doi.org/10.1098/rstb.2007.2170>
- Collmer, A., Badel, J. L., Charkowski, A. O., Deng, W.-L., Fouts, D. E., Ramos, A. R., Rehm, A. H., Anderson, D. M., Schneewind, O., van Dijk K. and Alfano, J. R. (2000). *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *PNAS* 97, 16, 8770–8777.

- Cooper, W.R., Jia, L. and Goggin, L. (2005). Effects of jasmonate-induced defenses on rootknot nematode infection of resistant and susceptible tomato cultivars. *J. Chem. Ecol.* 31, 1953–1967.
- Cornelis G. (2006). The type III secretion injectisome. *Nature Reviews Microbiology* **volume4**, pages811–825.
- Davies PJ, editor. *Plant Hormones*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers (2004). Biosynthesis, Signal Transduction, Action.
- Dempsey DA, Klessig DF. 2012. SOS-too many signals for systemic acquired resistance? *Trends in Plant Science* 17, 538–545.
- Destefano-Beltran L., Knauber D., Huckle L. and Suttle J. (2006). Chemically forced dormancy termination mimics natural dormancy progression in potato tuber meristems by reducing ABA content and modifying expression of genes involved in regulating ABA synthesis and metabolism. *Journal of Experimental Botany* 57 (11): 2879-2886.
- Devi K. and Kothamasi D. (2009). *Pseudomonas fluorescens* CHA0 can kill subterranean termite *Odontotermes obesus* by inhibiting cytochrome c oxidase of the termite respiratory chain. 300(2):195-200. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01782.x.
- Diaz-Perez C., Cervantes C., Campos-Garcia J., Julian-Sanchez A. and Riveros-Rosas H. (2007). Phylogenetic analysis of the chromate ion transporter (CHR) superfamily. Volume 274, 23, p. 6215-6227, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06141.x>
- Dicke M., Jetske G. de Boer, Hofte M. and Rocha-Granados C. (2003). Mixed Blends of Herbivore-Induced Plant Volatiles and Foraging Carnivorous Arthropods. Vol. 101, (1) p. 38-48.
- Ding M., Tian C., Cheng S. and Yuan J. (2009). Inoculum size-dependent interactive regulation of metabolism and stress response of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by comparative metabolomics. *Journal of Biotechnology*, 144, 279-286.
- Dixon A., Achnine L., Kota, P., Liu J., Reddy M. and Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Molecular plant pathology*, 3, 371390.
- Dong HP, Peng J, Bao Z, Meng X, Bonasera JM, Chen G, Beer SV, Dong HS (2004). Downstream divergence of ethylene signaling pathway for harpin-stimulated *Arabidopsis* growth and insect defense. *Plant Physiol* 136: 3628–38.

- Dong, X., Tsuda, L., Zavitz, K.H., Lin, M., Li, S., Carthew, R.W., Zipursky, S.L. (1999). ebi regulates epidermal growth factor receptor signaling pathways in *Drosophila*. *Genes Dev.* 13(8): 954--965.
- Du, J., Rietman, H., Vleeshouwers, V.G.A.A. (2014). Agroinfiltration and PVX Agroinfection in Potato and *Nicotiana benthamiana*. *J. Vis. Exp.* 83, e50971.
- Eberhard S., Doubrava N., Marfa V., Mohnen D., Southwick A., Darvill A., and Albersheim P. (1989). Pectic Cell Wall Fragments Regulate Tobacco Thin-Cell-Layer Explant Morphogenesis. *The Plant Cell*, 1, 747-755.
- Elbein A.D., Pan Y.T., Pastuszak I. and Carroll D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13, 17r-27r.
- Escobar-Henriques M, et al. (2003) Transcription initiation of the yeast IMD2 gene is abolished in response to nutrient limitation through a sequence in its coding region. *Mol Cell Biol* 23(17):6279-90
- Fiehn O. (2002). Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Plant molecular biology*, 48, 155-171.
- Fiserova H., Mikusova Z., Klems M. (2008) Estimation of ethylene production and 1-aminocyclopropane-1- carboxylic acid content in plants by means of gas chromatography, *Plant Soil Environ.*, 54, 2008 (2): 55-60.
- Galston A. W., Kaur-Sawhney R., Altabella T., and Tiburcio A. F. (1997), *Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress*. *Bot. Acta* 110, 197-207.
- Genin S, Gough CL, Zischek C, Boucher CA. (1992). Evidence that the hrpB gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Microbiol.* 6:3065–3076.
- Gharti-Chhetri G., Cherdshewasart W., Dewulf J., Jacobs M. (2006). Polyethylene glycol-mediated direct gene transfer in *Nicotiana* spp., Volume 85, 2, p.345-351, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb04745.x>
- Ghosh SK, et al. (2004) The Iml3 protein of the budding yeast is required for the prevention of precocious sister chromatid separation in meiosis I and for sister chromatid disjunction in meiosis II. *Curr Genet* 46(2):82-91.

- Goodin, M. M., Zaitlin, D., Naidu, R. A. and Lommel, S. A. (2008). *Nicotiana benthamiana*: Its History and Future as a Model for Plant–Pathogen Interactions. *Mol Plant Microbe Interact.* 21, 8, 1015–1026.
- Gopalan, S., Wei, W., and He, S.Y. (1996). hrp gene-dependent induction of hin1: a plant gene activated rapidly by both harpins and the avrPto gene-mediated signal. *Plant Journal* 10, 4, 591-600.
- Grant T, Frost DR, Caldwell JP, Gagliardo RH, Celio FB, Kok, Philippe JR, Means DB, Noonan BP, Schargel WE and Wheeler W. (2006) Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia, Athesphatanura, Dendrobatidae). Bulletin of the AMNH ; no. 299. Bulletin of the American museum of natural history central park west at 79th street, New York, NY 10024 Number 299.
- Hag L. and Curtis Ft.W. (1968). Production of Ethylene by fungi, *Science*, 159: 1357-1358.
- Hammond-Kosack, K. and Jones, J. (2000). Responses to Plant Pathogens in "Biochemistry & Molecular Biology of Plants" by B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones. *American Society of Plant Physiologists*, 1102-1156 pp.
- Hayat S. and Ahmad A. (2007). *Salicylic Acid: A Plant Hormone*. Springer, UK., ISBN-13: 978-1-4020-5183-8.
- Hayat S., Fariduddin Q., Ali B., Ahmad A. (2005): Effect of salicylic acid on growth and enzyme activities of wheat seedlings. *Acta Agronomica Hungarica*, 53: 433–437.
- He, S.Y., Huang, H.C., and Collmer, A. (1993). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpins: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* 73, 1255-1266.
- Heath, M. (1998). Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 117-124.
- Hoffman, N., (2008). In brief Absciscic Acid–Mediated Suppression of Systemic Acquired Resistance Signaling. *The Plant Cell* 20, 6, 1425.
- Hofius, D., Tsitsigiannis, D. I., Jones, J. D.G. and Mundy, J. (2007). Inducible cell death in plant immunity. *Sem. in Cancer Biology* 17, 166–187.

- Horsch, R.B., Rogers, S.G. and Fraley, R.T. (1985). Transgenic plants. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 50, 433-437.
- Hueck, C.J. (1998). Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. Microbiol Mol Biol Rev. 62, 2, 379–433.
- Huo, R., Wang, Y., Ma, L.-L., Qiao, J.-Q., Shao, M. and Gao, X-W. (2010) Assessment of inheritance pattern and agronomic performance of transgenic rapeseed having harpinXoocencoding hrf2 gene. Transgenic Res 19, 841–847.
- Idrees M, Nasir S., Naeem M., Aftab T., Khan M.M.A., Moinuddin (2012). Gamma irradiated sodium alginate induced modulation of phosphoenolpyruvate carboxylase and production of essential oil and citral content of lemongrass. *Industrial Crop and Products*, 40 (2012), pp. 62-68
- Idrees, M., Naeem, M., Aftab, T., Khan Moinuddin, M. M. A. (2011). Salicylic acid mitigates salinity stress by improving antioxidant defence system and enhances vincristine and vinblastine alkaloids production in periwinkle [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]. *Acta Physiol Plant* 33, 987–999.
- Idrees, M., Khan, M.M.A., Aftab, T., Naeem, M., 2010. Synergistic effects of gibberellic acid and triacontanol on growth, physiology, enzyme activities and essential oil content of *Coriandrum sativum* L. *Asian Aust. J. Plant Sci. Biotechnol.* 4, 24–29.
- Jang, Y.-S., Sohn, S.-I., and Wang, M.-H. (2006). The hrpN gene of *Erwinia amylovora* stimulates tobacco growth and enhances resistance to *Botrytis cinerea*. *Planta* 223, 449-456.
- Jordan, P., Arnscheidt, J., McGrogan, H., McCormick, S. (2005). *High-resolution phosphorus transfers at the catchment scale: the hidden importance of non-storm transfers*. *Hydrology and Earth Systems Sciences*, 9(6):685-691.
- Kim, J.F. and Beer, S.V. (2000). hrp genes and harpins of *Erwinia amylovora*: a decade of discovery. In: Vanneste, J.L. (Ed.) *Fire Blight and its Causative Agent, Erwinia amylovora*. CAB International, UK, Wallingford, pp. 141–162.
- Kim J. & Kim H. (2017). Effects of minimal media vs. complex media on the metabolite profiles of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*.

- Král'ová – Hromadova, Bazsalovicsova E., Bokorova S. and Hanzelova V. (2012). Ribosomal ITS2 structure in *Caryophyllaeus laticeps* and *Caryophyllaeus brachycollis* (Cestoda: Caryophyllidea), parasites of cyprinid fish. *Helminthologia*, 50, 4: 235 – 237. DOI: 10.2478/s11687-013-0135-1.
- Kunkel B.N. and D. M. Brooks (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opin Plant Biology* 5: 325-332.
- Lee. T.T., and Skoog F. (1965). Effects of hydroxybenzoic acids on indoleacetic acid inactivation by tobacco callus extracts. *Physiol Plant*. 18, 386 – 402.
- Li, R. and Fan, Y. (1999). Reduction of lesion growth rate of blight plant disease in transgenic potato expressing harpin protein. *Sci China C Life Sci*. 42, 1, 96-101.
- Li Z. and Yu Y. (2016). Protein Secondary Structure Prediction Using Cascaded Convolutional and Recurrent Neural Networks. *Cornell University Library*. DOI: arXiv:1604.07176.
- Li, X., Kuromi, H., Briggs, L., Green, D.B., Rocha, J.J., Sweeney, S.T., Bullock, S.L. (2010). Bicaudal-D binds clathrin heavy chain to promote its transport and augments synaptic vesicle recycling. *EMBO J*. 29(5): 992--1006.
- Li Q, Zhao XQ, Chang AK, Zhang QM, Bai FW (2012). Ethanol-induced yeast flocculation directed by the promoter of TPS1 encoding trehalose-6-phosphate synthase 1 for efficient ethanol production. *Metab Eng* 14(1):1-8.
- Li, M.C. (2007). Type III Secretion System of Phytopathogenic Bacterium *Pseudomonas syringae*: From Gene to Function. Academic Dissertation. Department of Biological and Environmental Sciences. *Division of General Microbiology*. Faculty of Biosciences and Graduate School in Biotechnology and Molecular Biology (GSBM) University of Helsinki. (pg. 21, 27, 31).
- Liu F, Liu H, Jia Q, Wu X, Guo X, Zhang S, Song F, Dong H (2006). The internal glycine-rich motif and cysteine suppress several effects of the HpaGXooc protein in plants. *Phytopathology* 96:1052–9.
- Liu J, Huang X, Withers BR, Blalock E, Liu K, Dickson RC (2013). Reducing sphingolipid synthesis orchestrates global changes to extend yeast lifespan. *Aging Cell* 12(5):833-41.
- Loewus F. and Murthy P. (2000). *myo*-Inositol metabolism in plants. Volume 150, 1, p. 1 – 9. DOI: 10.1016/S0168-9452(99)00150-8.

- Luczkiewicz M., Kokotkiewicz A. and Gold D. (2014). Plant growth regulators affect biosynthesis and accumulation profile of isoflavone phytoestrogens in high-productive in vitro cultures of *Genista tinctoria*. Volume 118, 3, p. 419-429.
- Lynch J.M. (1972) Identification of substrates and isolation of microorganisms responsible for ethylene production in the soil *Nature*, 240: 45-46.
- Lyon GD & Newton AC (2000). Implementation of elicitor mediated induced resistance in agriculture. In: Agrawal A.A., Tuzun S., Bent E. (eds). Induced plant defence against pathogens and herbivores: *Biochemistry, ecology and agriculture*, pp. 299-318. APS Press, St. Paul, MN.
- Lulai E.C., Suttle J.C. and Pederson S.M. (2008). Regulatory involvement of abscisic acid in potato tuber wound-healing. *Journal of Experimental Botany* 59: 1175-1186.
- Machrafi Y., Prevost D. and Beauchamp C.J. (2006) Toxicity of phenolic compounds extracted from bark residues of different ages. Volume 32. 12, p. 2595-615.
- Mauch F, Hadwiger LA, Boller T (1984) Ethylene, symptom, not signal for the induction of chitinase and 1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitor. *Plant Physiol.* 76, 607-11.
- Mauch-Mani, B. and Mauch, F. (2005). The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 409-414.
- Meyer AE, et al. (2007) The specialized cytosolic J-protein, Jjj1, functions in 60S ribosomal subunit biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(5):1558-63.
- Mota LJ. And Cornelis GR. (2005). The bacterial injection kit: type III secretion systems. Vol 37, 4, p. 234-249. DOI: <https://doi.org/10.1080/07853890510037329>.
- Mueller M.J. (1997). Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiol. Plant* 100: 653-663.
- Murray RDH., Mendez J., Brown SA. Coumarin activity in plants and bioorganism aspects. *John Wiley*. 1982; 2: 45-55.
- Naeem S, Bunker DE, Hector A, Loreau M, Perrings C (2009) Biodiversity, ecosystem functioning and human wellbeing: an ecological and economic perspective. Oxford University Press.

- Naeem, M., Khan, M.M.A., Moinuddin, Idrees, M., Aftab, T., (2011). Triacanolmediated regulation of growth and other physiological attributes, active constituents and yield of *Mentha arvensis* L. *Plant Growth Regul.* 65, 195–206.
- Nahar, K., Kyndt, T., de Vleeschauwer, D., Hofte, M. and Gheysen, G. (2011). The jasmonate pathway is a key player in systemically induced defense against root knot nematodes in rice. *Plant Physiol.* 157, 305–316.
- Nguyen L., Paulsen IT., Tchieu J., Hueck CJ., Saier MH Jr (200). Phylogenetic analyses of the constituents of Type III protein secretion systems. *J Mol Microbiol Biotechnol*, Volume 2, 2, p.125-144.
- Oh, C.S., and Beer, S.V. (2007). AtHIPM, an Ortholog of the apple HrpN-Interacting Protein, is a negative regulator of plant growth and mediates the growth-enhancing effect of HrpN in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 145: 426-436.
- Ohashi Y, Umesaki Y, Ushida K (2004) Transition of the probiotic bacteria, *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the gastrointestinal tract of a pig. *International Journal of Food Microbiology* 96(1):61-66.
- Oikawa S, Imai M, Inuzuka C, Tawaragi Y, Nakazato H, Matsuo H. Structure of dog and rabbit precursors of atrial natriuretic polypeptides deduced from nucleotide sequence of cloned cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1985, 132: 892-9.
- Ozalvo, R., Cabrera, J., Escobar, C., Christensen, S.A., Borrego, E.J., Kolomiets, M.V., Castresana, C., Iberkleid, I. and Horowitz, S.B. (2014). Two closely related members of Arabidopsis 13-lipoxygenases (13-LOXs), LOX3 and LOX4, reveal distinct functions in response to plant-parasitic nematode infection *Mol. Plant Pathol.* 15, 319–332.
- Ozturk S. and Ercisli S. (2006) Chemical composition and in vitro antibacterial activity of *Seseli libanotis*. Vol 22, 3, p. 261-265.
- Panagouleas C., Skaltsa H., Diamanto L., Skaltsounis A.L. and Sokovic M. (2003). Antifungal activity of secondary metabolites of *centaurea raphanina* ss. Mixta, growing wild in Greece. Vol. 41, 4, p. 266-270. DOI: <https://doi.org/10.1076/phbi.41.4.266.15664>.
- Pare P. and Tumlinson J. (1999). Plant volatiles as a Defense against insect herbivores. *Plant Physiology*. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.121.2.325>

- Park H, Suzuki T, Lennarz WJ (2001) Identification of proteins that interact with mammalian peptide:N-glycanase and implicate this hydrolase in the proteasome-dependent pathway for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20):11163-8.
- Park OH, Park J, Yu M, An HT, Ko J and Kim YK (2016). Identification and molecular characterization of cellular factors required for glucocorticoid receptor-mediated mRNA decay. *Genes & development*. Volume 15, 30, p. 2093-2105. DOI: 10.1101/gad.286484.116
- Park J, Floss D, Levesque-Tremblay V, Bravo A. and Harrison M (2015). Arbuscule development during AM symbiosis. *Plant Physiology Preview*. Published on November 9, 2015, as DOI:10.1104/pp.15.01155.
- Paterson AH., Lander ES., Hewitt JD, Peterson S., Lincoln SE and Tanksley SD. (1988). Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature*. Vol. 225, 6192, p. 721-726. DOI: <https://doi.org/10.1038/335721a0>.
- Pavli, O.I., Athanasouli, V., Tampakaki, A., and Skarakis, G.N. (2008). Preliminary evaluation of the effect of transgenic harpin expression in plants on resistance to viral diseases. In 12th National Congress in Plant Breeding. 8-10 October 2008. Naoussa, pp. 271277.
- Pavli, O.I., Kelaidi, G.I., Tampakaki, A.P. and Skaracis, G.N. (2011). The hrpZ Gene of *Pseudomonas syringae* pv.phaseolicola Enhances Resistance to Rhizomania Disease in Transgenic *Nicotiana benthamiana* and Sugar Beet. *Plos One*. 6, 3.
- Pavli OI, Tampakaki AP, Skaracis GN (2012). High Level Resistance against Rhizomania Disease by Simultaneously Integrating Two Distinct Defense Mechanisms. *Plos One*. 7, 12, e51414.
- Peng, S., Laza, R.C., Visperas, R.M., Khush, G.S., Virk, P., Zhu, D., (2004). Rice: progress in breaking the yield ceiling. In: New direction for a diverse planet. Proceedings of the 4th International Crop Science Congress. September 26–October 1, 2004. Brisbane, Australia Published on CD.
- Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, Marsischky G, Roelofs J, Finley D, Gygi SP (2003) A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* 21(8):921-6.
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A. Van der Ent S, Van Wees SCM (2009) Networking by small-molecules hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5: 308-316.

- Primrose S. (1977) Evaluation of the role of methional, 2-keto-4-methylthiobutyric acid and peroxidase in ethylene formation by *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 98: 519-528.
- Portaliou, A. G., Tsolis, K. C., Loos, M. S., Zorzini, V. and Economou, A. (2016). Type III Secretion: Building and Operating a Remarkable Nanomachine. *Trends Biochem Sci* 41, 2, 175-189.
- Preston CA, LaueG, Baldwin IT (2001) Methyl gasmonate is blowing in the wind, but can it act as a plant-plant airborne signal? *Biochem. Syst. Ecol.* 29:1007-1023.
- Price-Whelan A., Dietrich LE and Newman DK (2006). Rethinking ‘secondary’ metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature chemical biology*. Volume 2, 2, p.71-78.
- Ralston-Hooper K., Hopf A., Oh C., Zhang X., Adamec J. and Sepulveda M. S. 2008. Development of GCxGC/TOF-MS metabolomics for use in ecotoxicological studies with invertebrates. *Aquatic Toxicology*, 88, 48-52.
- Raskin, I. (1992). The role of salicylic acid in plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43: 439-463.
- Ren H, Song T, Wu T, Sun L, Liu Y, Yang F, Chen ZY, Dong H (2006). Effects of a biocontrol bacterium on growth and defence of transgenic rice plants expressing a bacterial type-III effector. *Ann Microbiol* 56:281–287.
- Saier, M. H. (2006). Protein Secretion Systems in Gram-Negative Bacteria. *Microbe* 1, 9, 414–419.
- Saier, M. H. (2004). Evolution of bacterial type III protein secretion systems. *Trends in Microbiology*. Volume 12, 3, p. 113-115.
- Schreiber, K. and Desveaux, D. (2008). Message in a Bottle: Chemical Biology of Induced Disease Resistance in Plants. *Plant Pathol. J.* 24, 3, 245-268.
- Shao H.B., L.Y. Chu, M.A. Shao, C. Abdul Jaleel and M. Hong-Mei, 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comp. Rend. Biol.*, 331: 433–441
- Sonnleitner E. and Haas D. (2011). Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Applied microbiology and biotechnology*. Vol 91, 1, p. 63-79. DOI: 10.1007/s00253-011-3332-1.

- Staskawicz BJ, Dahlbeck D, Keen NT (1984). Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycine max* (L.) Merr. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6024-6028.
- Strobel, G. A., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R. & Hess, W. M. (1996). Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology* 142, 435-440.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2006). Production of reactive oxygen species by freezing stress and the protective roles of antioxidant enzymes in plants. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, Vol.1 No.1.
- Takamura T., Sakurai M., Ota T., Ando H., Honda M. and Kaneko S. (2004). Genes for systemic vascular complications are differentially expressed in the livers of Type 2 diabetic patients. *Diabetologia*. Volume 47, 4, p. 638-647.
- Tampakaki, A.P. and Panopoulos, N.J. (2000). Elicitation of Hypersensitive Cell Death by Extracellularly Targeted HrpZPsph Produced In Planta, *Mol Plant Microbe Interact.* 13, 12, 1366–1374.
- Tampakaki, A. P., Hatziloukas, E. and Panopoulos, N.J. (2009). Plant Pathogens, Bacterial. *Encyclopedia of Microbiology* (Moselio Schaechter, Editor), Oxford, *Elsevier*, pp. 655-677.
- Tampakaki, A.P. (2014). Commonalities and differences of T3SSs in rhizobia and plant pathogenic bacteria. *Frontiers in Plant Science* 5, 114.
- Tassoni A, Antognoni F, Battistini ML, Sanvido OA, Bagni N (1998). Characterization of spermidine binding to solubilized plasma membrane proteins from Zucchini hypocotyls. *Plant Physiol* 117:971-977.
- Thomas NA, Brett Finlay B (2003). Establishing order for type III secretion substrates—a hierarchical process. *Trends Microbiol* 11:398-403.
- Tierens FM, Thomma BP, Brouwer M, Schmidt J, Kistner K, Porzel A, Mauch-Mani B, Cammue BP, Broekaert WF. (2001). Study on the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of *Arabidopsis* to microbial pathogens. *Plant Physiol*, 125: 1688–1699.

- Tomar P, Bhatia A, Ramdas S, Diao L, Bhanot G and Sinha H (2006). Sporulation genes associated with sporulation efficiency in natural isolates of yeast. *PLoS One* 8(7):e69765.
- Troppens DM, Dmitriev RI, Papkovsky DB, O'Gara F and Morrissey JP (2013) Genome-wide investigation of cellular targets and mode of action of the antifungal bacterial metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 13(3):322-34.
- Tseng SF, Shen ZJ, Tsai HJ, Lin YH and Teng SC (2009). Rapid Cdc13 turnover and telomere length homeostasis are controlled by Cdk1-mediated phosphorylation of Cdc13. *Nucleic Acids Res* 37(11):3602-11.
- Turner, J. G., C. Ellis, and A. Devoto. (2002). The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* 14:S153-164.
- Ueki, S., Magori, S., Lacroix, B. and Citovsky V. (2013). Transient Gene Expression in Epidermal Cells of Plant Leaves by Biolistic DNA Delivery. *Methods Mol Biol.* 940, 17–26.
- Wang X, et al. (2008) Disruption of Rpn4-induced proteasome expression in *Saccharomyces cerevisiae* reduces cell viability under stressed conditions. *Genetics* 180(4):1945-53.
- Weckwerth W. (2003). Metabolomics in systems biology. *Annual Review of plant biology*. Vol 54, p. 669-689.
- Wei Z.-M. and Beer S.V. (1995). hrpL activates *Erwinia amylovora* hrp gene transcription and is a member of the ECF subfamily of σ factors. *Journal of Bacteriology* 177, 6201-6210.
- Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A. and Beer, S.V. (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 257, 85-88.
- Wengelnik K. and Bonas U. (1996). HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the hrp cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of bacteriology*. Volume 178, 12, p. 3462-3469.
- Wengelnik K., Rossier O. and Bonas U. (1999). Mutations in the regulatory Gene hrpG of *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* Result in Constitutive Expression of All hrp Genes. *Journal of Bacteriology*. 181 (21), p.6828.
- Wink, M., 1988. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Genetics* 75, 225–233.

- Wink, M., 1999a. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. *Annual Plant Reviews* Vol. 2. Sheffield Academic Press, Sheffield.
- Wink, M., 1999b. Function of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. *Annual Plant Reviews*. Sheffield Academic Press, Sheffield.
- Winkel-Shirley B. (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*. Volume 126, 2, p. 485-49.
- Wu, F.-S. and Feng, T.-Y. (1999). Delivery of plasmid DNA into intact plant cells by electroporation of plasmolysed cells. *Plant Cell Reports* 18, 381–386.
- Wu X, Wu T, Long J, Yin Q, Zhang Y, Chen L, Liu RX, Gao TC, Dong H (2007). Productivity and biochemical properties of green tea in response to a bacterial type-III effector protein and its variants full length and functional fragments of HpaGXoo, a harpin protein from the bacterial rice leaf streak pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Journal Biosci* 32:1119–1131.
- Wuyts N., Waele D. and Swennen R. (2006). Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grand naine) roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, (5-6), p. 308, DOI: 10.1016/j.plaphy.2006.06.005
- Xu, Y.-J., Wang, C., Ho, W. E. & Ong, C. N. 2014. Recent developments and applications of metabolomics in microbiological investigations. *TrAC. Trends in Analytical Chemistry*, 56, 37-48.
- Yan, C. and Daoxin X. (2015). Jasmonate in plant defence: sentinel or double agent? *Plant Biotechnology Journal* 13, 9, 1233–1240.
- Yasuda, M., Ishikawa, A., Jikumaru, Y., Seki, M., Umezawa, T., Asami, T., Maruyama- Nakashita, A., Kudo, T., Shinozaki, K., Yoshida, S., and Nakashita, H. (2008). Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid– mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 20, 1678–1692.
- Zhang C, Qian J, Bao Z, Hong X, Dong H (2007). Absciscic acid mediates *Arabidopsis* drought tolerance induced by HrpNEa in the absence of ethylene signaling. *Plant Mol Biol Rep* 25:98–114.